

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Biologická aktivita makromycet – A**

**Biological activity of macromycetes – A**

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Macáková

Hradec Králové 2011

Lenka Zvonková

Poděkování:

Děkuji Ing. Kateřině Macákové za odborné vedení, cenné rady, připomínky a pomoc při tvorbě diplomové práce. Tato práce vznikla v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2011 SVV/2011/263002.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím literatury uvedené v seznamu literatury, ze které jsem čerpala.

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| 1. Úvod.....   | 6  |
| 2. Cíl práce.....  | 11 |
| 3. Teoretická část.....  | 12 |
| 3.1. Úvod .....  | 12 |
| 3.2. Charakteristika jednotlivých tříd a řádů sledovaných druhů .....  | 12 |
| 3.2.1. Systematické zařazení sledovaných taxonů (podle Váni, 1996)...  | 14 |
| 3.2.2. Morfologická charakteristika a výskyt jednotlivých taxonů.....  | 15 |
| 3.3. Chemická stavba hub .....   | 26 |
| 3.3.1. Primární metabolity.....  | 27 |
| 3.3.2. Sekundární metabolity.....  | 29 |
| 3.3.3. Minerální látky .....   | 32 |
| 3.4. Antioxidační aktivita .....   | 32 |
| 3.4.1. Volné radikály (VR).....  | 32 |
| 3.4.2. Vznik volných radikálů.....   | 33 |
| 3.4.3. Ochrana před volnými radikály .....   | 33 |
| 3.4.4. Rovnováha mezi antioxidanty a volnými radikály .....  | 34 |
| 3.4.5. Nemoci způsobené přítomností volných radikálů.....  | 34 |
| 3.4.6. Stanovení antioxidační aktivity .....   | 35 |
| 3.4.7. Sekvenční injekční analýza (SIA).....   | 35 |
| 4. Experimentální část a výsledky .....  | 38 |
| 4.1. Potřeby .....   | 38 |
| 4.1.1. Rozpouštědla, chemikálie a standardy .....  | 38 |
| 4.1.2. Detekční činidla.....   | 39 |
| 4.1.3. Přístrojové vybavení .....  | 42 |
| 4.1.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....   | 43 |
| 4.1.5. Chromatografický adsorbent .....  | 43 |
| 4.2. Příprava extraktů .....   | 44 |
| 4.2.1. Materiál.....   | 44 |
| 4.2.2. Extrakce a příprava lyofilizátu z plodnice houby.....   | 44 |
| 4.3. Hodnocení extraktů barevnými reakcemi na TLC .....  | 46 |
| 4.3.1. Faktické údaje.....   | 46 |
| 4.3.2. Obrazová část.....  | 47 |
| 4.3.3. Vyhodnocení reakcí na detekce D 1 – D 16.....   | 63 |
| 4.4. Stanovení antioxidační aktivity metodou SIA se spektrofotometrickou<br>detekcí pomocí DPPH radikálu ..... | 65 |
| 4.4.1. Postup práce .....  | 65 |
| 4.4.2. Hodnoty naměřených antioxidačních aktivit u sledovaných<br>taxonů .....                                 | 67 |
| 4.4.3. Porovnání antioxidační aktivity taxonů při jednotlivých<br>koncentracích .....                          | 81 |
| 5. Diskuze.....  | 83 |
| 6. Literatura .....  | 89 |
| ABSTRAKT .....   | 95 |
| ABSTRACT .....   | 96 |

## **Seznam zkratek**

AMK – aminokyseliny

AO – antioxidanty

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DPPH – 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl

MK – mastné kyseliny

RNS – reaktivní formy dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

SIA – sekvenční injekční analýza

TAG – triacylglyceroly

TLC – tenkovrstvá chromatografie

VR – volné radikály

VMK – vyšší mastné kyseliny

# 1. Úvod

Houby (*Fungi*) jsou definovány jako eukaryotní, stélkaté, jedno a mnohobuněčné organismy s velkou druhovou rozmanitostí – je známo více než 100 000 různých druhů (Bielli, 2001). Houby se obecně dělí na makromycety (tzv. velké houby) a mikromycety, které jsou buď vláknité (např. plísně), nebo jednobuněčné (kvasinky).

Makromycety mají plodnice větší jak 1 mm a většinou se rozmnožují sexuálně. Většina mikromycet má plodnice menší jak 1 mm a rozmnožují se v tzv. imperfektní formě, což je asexuální fáze životního cyklu. Na myceliu se vytvářejí specializované nosiče konidiofory, kde vznikají nepohlavní spory (Keizer, 2005).

Hlavním předmětem této práce byly vlastní (vyšší) houby (*Eumycota*), které jsou podle Váni (1996) děleny na 4 různé pododdělení – (*Zygomycotina*), (*Ascomycotina*) – houby vřeckovýtrusné, (*Basidiomycotina*) – houby stopkovýtrusé a tzv. nedokonalé houby (*Deuteromycotina*), které se rozmnožují pouze nepohlavním způsobem.

Jak uvádí Svrček (1996) a Klán (1989), houby se řadí mezi heterotrofní organismy, neboť nejsou schopné fotosyntetické asimilace jako zelené rostliny, a proto přijímají organické látky z těl jiných organismů. Odumřelé organické látky buď rozkládají svými enzymy na jednodušší (tento způsob výživy je charakteristický pro saprofyty), nebo žijí v symbióze se zelenými rostlinami (mykorrhiza, lichenismus), anebo jsou výživou odkázány na živou rostlinu nebo živočicha. Způsob výživy zodpovídá za závislost hub na vlhkosti vnějšího prostředí a také za charakteristický tvar stélky (Jablonský a Šašek, 2006).

Stélka (thalus), jak již bylo řečeno, může být jedno nebo mnohobuněčná a může dosahovat několika metrů. Většina hub tvoří vlákna – tzv. hyfy, která jsou rozvětvená a propletená a tvoří tak podhoubí (mycelium). Podhoubí někdy tvoří kulovité kompaktní útvary nazývané sklerocia nebo spletená vlákna (rhizomofory) či blanité útvary (syrocia). Nepravidelné pletivo (plektenchym) tvoří nejpokročilejší houby. Z plectenchymu jsou pak vytvářeny plodnice nebo jiné kompaktní struktury (Šašek, 2006).

Houbové metabolické pochody se více podobají metabolickým procesům živočichů než rostlin (Váňa, 1996).

Narozdíl od rostlin, kde zásobní látkou je škrob, transportní látkou glukóza, sacharóza a fruktóza, jsou u hub hlavními zásobními látkami glykogen a tuky, transportní látkou jsou cukerné alkoholy (manitol a arabitol), z disacharidů pak trehalózy. Hlavní složkou buněčné stěny hub je chitin, který lze také nalézt v živočišné říši, ne však v rostlinné (Šašek, 2006).

Jak popisuje Váňa (1996), mohou buněčné stěny hub obsahovat chitin pouze ve stopovém množství nebo nemusí být přítomen vůbec. Místo něj je pak ve stěně nahrazen mananem, polymery galaktózy a galaktosaminu, nebo celulózou. U některých skupin hub může být přítomen chitin i celulóza současně.

Další obsahovou látkou nalezenou v říši hub je lecitin, který je schopen vázat fosfor v živočišných buňkách, např. v mozku nebo svazech (Škubla, 1989).

Důležitým znakem hub, kterým se liší od ostatních organismů, je syntéza aminokyseliny lyzinu. Zatímco jiné organismy syntetizují lyzin přes kyselinu diaminopimelinovou, houby ji syntetizují přes  $\alpha$ -aminoadipovou. Tyto dvě rozdílné metabolické cesty dokazují, že se houby vyvinuly nezávisle v dávných dobách historického vývoje (Šašek, 2006).

### **Význam hub pro člověka a životní prostředí**

Z pohledu člověka jsou makromycety nejen důležitým zdrojem potravy, ale také mohou prospívat našemu zdraví nebo mu naopak škodit. Význam mikromycet je podstatně rozmanitější. Jablonský a Šašek (2006) ve své knize *Jedlé a léčivé houby* popisují důležitost mikromycet pro své metabolické pochody, které jsou široce využívány v potravinářském průmyslu. Mikroskopické vláknité houby mohou být příčinou mykotických onemocnění, mohou produkovat jedovaté a rakvinotvorné mykotoxiny. Na druhou stranu sehrály houby zásadní roli v rozvoji antibakteriální léčby objevem penicilinu, který byl izolován z druhu *Penicillium notatum*. Tento objev zapříčinil významný rozmach farmaceutického průmyslu.

U některých hub byly prokázány účinky proti bakteriím, virům, plísním, vzniku a nárůstu tumorů, alergiím, zánětlivým procesům, sklerotickým pochodům v cévách, dále pak schopnosti snižovat glykémii. Některé mají dokonce

hepatoprotektivní efekt či schopnost posílit imunitní systém (Kalač, 2008). Tyto příznivé účinky hub jsou připisovány sekundárním metabolitům, což jsou chemické látky obsažené v tělech hub.

Sekundární metabolity hub tedy představují velmi perspektivní skupinu látek v oblasti medicíny. Vybraná skupina hub, jež jeví příznivé účinky na lidské zdraví, je shrnuta v Tab. 1.

Tab. 1: Účinky léčivých hub (převzato z Jablonský a Šašek, 2006).

| Vybrané druhy léčivých hub |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Účinky použitých hub       | Ab | Cs | Ff | Fv | Gf | Gl | He | Io | Le | Po | Pu | Sc | Tv |
| Protivirové                | X  |    | X  | X  | X  | X  |    | X  | X  | X  | X  |    | X  |
| Protibakteriální           |    | X  | X  |    | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  |
| Protizánětlivé             |    |    |    | X  | X  | X  | X  | X  | X  |    |    | X  | X  |
| Protirakovinné             | X  | X  |    | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  |
| Při léčbě cukrovky         | X  | X  |    |    | X  | X  |    | X  |    |    |    |    |    |
| Léčba astmatu, plic        |    | X  |    |    | X  | X  |    |    |    |    | X  |    |    |
| Snižování stresu           |    | X  |    |    | X  | X  |    |    | X  |    |    |    |    |
| Posilující činnost jater   |    | X  |    |    | X  | X  |    | X  | X  |    | X  | X  | X  |
| Posilující činnost ledvin  |    | X  |    |    |    | X  |    |    | X  |    |    |    |    |
| Zvyšování libida           |    | X  |    |    |    | X  |    |    | X  |    |    |    |    |
| Imunomodulační             |    | X  |    | X  | X  | X  | X  | X  | X  |    | X  | X  | X  |
| Kardiovaskulární choroby   |    | X  |    |    |    | X  |    |    |    | X  |    |    |    |
| Posílení nervové činnosti  |    | X  |    |    |    | X  | X  |    |    | X  |    |    |    |
| Snižování cholesterolu     | X  | X  |    | X  | X  |    |    | X  | X  | X  |    |    |    |
| Snižování krevního tlaku   |    | X  |    |    | X  | X  |    | X  | X  |    |    |    |    |
| Léčba únavového syndromu   |    |    |    |    | X  | X  |    |    | X  |    |    |    |    |

**Zkratky označující jednotlivé druhy hub**

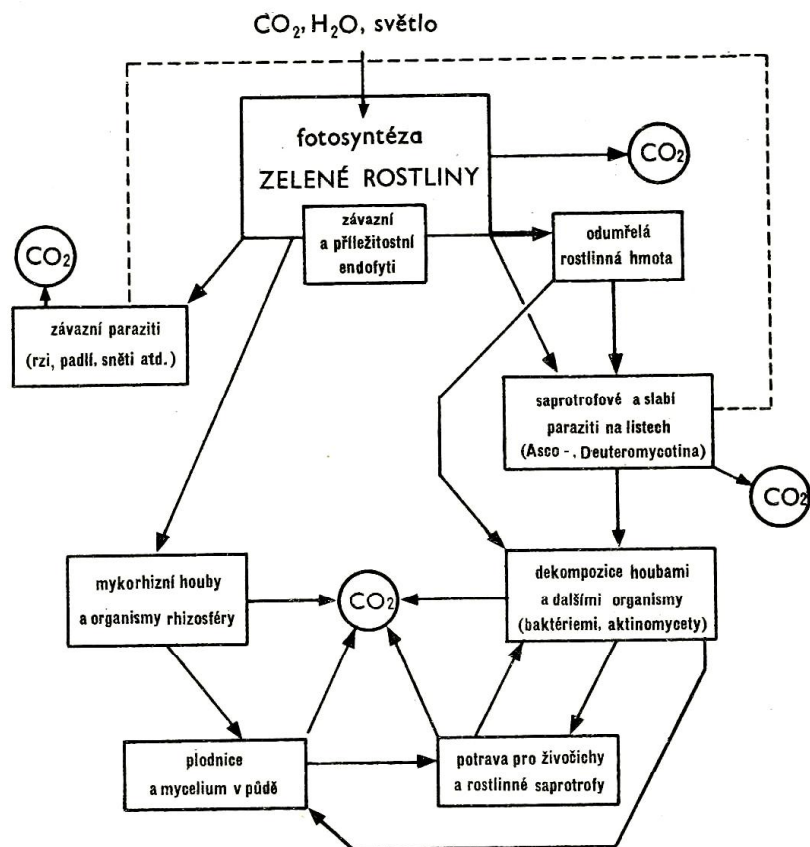
|    |                              |    |                              |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| Ab | <i>Agaricus brasiliensis</i> | Cs | <i>Cordyceps sinensis</i>    |
| Ff | <i>Fomes fomentarius</i>     | Fv | <i>Flammulina velutipes</i>  |
| Gf | <i>Grifola frondosa</i>      | Gl | <i>Ganoderma lucidum</i>     |
| He | <i>Hericium erinaceus</i>    | Io | <i>Inonotus obliquus</i>     |
| Le | <i>Lentinula edodes</i>      | Po | <i>Pleurotus ostreatus</i>   |
| Pu | <i>Polyporus umbellatus</i>  | Sc | <i>Schizophyllum commune</i> |
| Tv | <i>Trametes versicolor</i>   |    |                              |



Co se týče jedovatých hub, nejzávažnější jsou otravy amanitiny. Některé houby jsou jedovaté za syrova, ale dostatečně dlouhou tepelnou úpravou se toxické látky odstraní. I jedlé houby se mohou stát toxickými, jsou-li zkažené, zapařené či s počínající hnilobou. Jedovaté látky jsou většinou podobné hadím jedům a jen zřídka jde o alkaloidy typické pro jedovaté rostliny (Škubla, 1989, Keizer, 2005).

Houby jsou též průmyslově využívány v biologickém boji proti různým škůdcům (Klán, 1989).

Hrají zásadní roli ve volné přírodě, kde společně s bakteriemi plní funkci destruentů. Převádějí organické látky na anorganické, které znovu zelené rostliny využívají.



Obr. 1: Grafické znázornění vztahů mezi hlavními ekologickými skupinami hub se zdůrazněním jejich významu v koloběhu uhlíku v ekosystému. Na pravé straně je detritový potravní řetězec, na levé straně pak přímý odběr produktů fotosyntézy houbami. Oba procesy přispívají k růstu, dýchání, biomase hub a dalším půdním procesům (Klán, 1989).

Mohou také posloužit jako bioindikátory stavu životního prostředí. Přítomnost nebo naopak absence určitého druhu může poukazovat na správné hospodaření v přírodě. V koloběhu života na Zemi mají houby nezastupitelný význam a bez jejich činnosti by ostatní život zanikl (Jablonský a Šašek, 2006).

## 2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce byla příprava extraktů a lyofilizátů z hub, dále vypracování základního fytochemického screeningu 14 taxonů hub z čeledi *Albatrellaceae*, *Auriscalpiaceae*, *Boletaceae*, *Discinaceae*, *Gomphidiaceae*, *Hapalopilaceae* a *Russulaceae*. Screening jednotlivých druhů hub spočíval v získání dostupných informací o obsahových látkách hub s využitím domácí i zahraniční literatury a v důkazu určitých skupin obsahových látek pomocí TLC a selektivních detekcí. Detekce byly provedeny na přítomnost aminokyselin, cukrů, alkaloidů, aminů, fenolických sloučenin, laktonů, steroidů, sterolů, terpenů, triterpenů, karboxylových kyselin a vyšších alkoholů.

Závěrečná část diplomové práce je zaměřena na kvantifikaci antioxidační aktivity vodně-ethanolických extraktů hub s využitím metody sekvenční injekční analýzy (SIA). Stanovení spočívá v redukci stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) antioxidantem. Toto stanovení si klade za cíl odhalit extrakty s obsahem potenciálně účinných antioxidačních látek.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Úvod

Sledované druhy hub se systematicky zařazují do řádů *Boletales* (hřibotvaré), *Polyporales* (chorošotvaré) a *Russulales* (holubinkotvaré), které patří do podtřídy *Hymenomycetidae*, třídy *Homobasidiomycetes*, pododdělení *Basidiomycotina* a řádu *Pezizales* (kustřebkotvaré), jež se řadí do třídy *Ascomycetes*, pododdělení *Ascomycotina*. Pododdělení *Ascomycotina* (vřeckovýtrusé houby) a *Basidiomycotina* (stopkovýtrusé houby) jsou zařazeny do oddělení *Eumycota* – vlastní houby (Váňa, 1996).

### 3.2. Charakteristika jednotlivých tříd a řádů sledovaných druhů

Podle mikroskopických znaků, jako je uspořádání rozmnožovacích orgánů v sexuální bázi, se houby dělí na *Ascomycety* a *Basidiomycety*.

Houby třídy ***Basidiomycetes***, pod kterou kromě jiných spadají řády *Boletales*, *Polyporales* a *Russulales*, vytvářejí výtrusy na jedné až čtyřech stopečkách. Vyrůstají z vrcholu kyjovitých buněk, tzv. basidií. U většiny hub třídy *Basidiomycetes* dozrávají spory volně na vzduchu. Je-li potřeba určit, do kterého rodu se houba řadí, věnuje se pozornost barvě otisku výtrusného prachu, získaného položením kloboučku houby na sklo, fólii nebo černý či bílý papír. Při určování jednotlivých druhů hub je důležité zkoumat i mikroskopické znaky, jako je velikost a tvar spor, struktury hyf v různých částech klobouku a třeně. K identifikaci druhů je v mnoha případech nutné i sledování tvaru určitých buněk, např. cystid (Keizer, 2005).

Řád *Boletales* má dužnaté plodnice s rourkami, jež jsou snadno oddělitelné od klobouku. Jsou to převážně mykorhizní houby, které tvoří endo nebo ektotrofní mykorrhizu s úzkou vazbou na jeden nebo více druhů dřevin. Řada druhů patří k vynikajícím jedlým houbám, několik je však jedovatých. Doposud je známo 400 druhů hub řádu *Boletales* (Klán, 1989, Váňa, 1996).

*Polyporales* jsou masovité, kožovité až dřevovité konzistence. Hymenofor je většinou rourkatý nebo lamelovitý, vzácně může i chybět. Přítomnost skeletových či vazbových hyf dodává plodnicím charakteristickou tvrdou konzistenci. Houby řádu

*Polyporales* jsou dřevní saprofyty nebo saproparazité, hodně druhů je značně odolných na vysušení a mohou růst i na extrémních stanovištích (dřevěné ploty aj.). Několik druhů je obligátně parazitických. *Polyporales* zapříčiňují hnědou nebo bílou hnilobu dřeva (Váňa, 1996).



Obr. 2: Bílá hniloba (*Fomes fomentarius*) vlevo a hnědá hniloba (*Piptoporus betulinus*) vpravo (Keizer, 2005).

Do *Russulales* převážně patří mykorhizní druhy. Plodnice jsou dužnaté, klobouk je na spodní straně s lupeny. Dužnina heteromerní s kulovitými buňkami a ornamentovými výtrusy. Dosud je známo asi 450 druhů (Klán, 1989).



Obr. 3: Ectomycorrhiza *Lactarius* (Keizer, 2005).

Třída *Ascomycetes*, do níž kromě jiných systematicky zařazujeme řád *Pezizales*, tvoří výtrusy uvnitř kyjovitých, červovitých nebo měchýřovitých vřecek, které obvykle obsahují 8 výtrusů a jsou uloženy v hymeniu. Výtrusy uvnitř vřecka postupně dozrávají, a když jsou zralé, jsou pod tlakem z buňky vymrštěny. Tímto tlakem se vřecko na vrcholku roztrhne (u inoperkulátních) nebo se odtrhne víčko (u operkulátních typů) a oblak výtrusů je pak vymrštěn ke světlu. Vzdušné proudy je pak roznesou. Většina hub třídy *Ascomycetes* má jednoduché baňkovité, miskovité, talířovité, nebo terčovité plodnice (Keizer, 2005).

*Pezizales* je početný, dobře vymezený řád. Mycelium má jedno nebo vícejaderné buňky. U některých rodů se tvoří na myceliu podzemní sklerocia. Plodnice vyrůstají nad zemí nebo pod ní, v mechu, na rozkládajícím se papíru, dřevu, spáleništích a vlhkých zdech. Vřečka jsou operkulární, tj. mají na vrcholu víčko, které se po dozrání otevře a uvolní spory. Výživa je saprotrófní na organickém materiálu (Keizer, 2005, Klán, 1989, Váňa, 1996).

### 3.2.1. Systematické zařazení sledovaných taxonů (podle Váni, 1996)

- Říše: *Fungi* (houby)  
 Oddělení: *Eumycota* (vlastní houby)  
 Pododdělení: *Basidiomycotina* (houby stopkovýtrusé)  
 Třída: *Homobasidiomycetes*  
 Podtřída: *Hymenomycetidae* (houby rouškaté)  
 Řád: *Boletales* (hříbotvorné)  
 Čeleď: *Boletaceae* (hřibovité)  
     Druh: *Boletus impolitus* Fr. (hřib plavý)  
           *Boletus luridiformis* Rostk. (hřib kovář)  
           *Leccinum griseum* (kozák habrový)  
 Čeleď: *Gomphidiaceae* (slizákovité)  
     Druh: *Gomphidius maculatus* (Scop) Fr. (slizák skvrnitý)
- Řád: *Polyporales* (chorošotvaré)  
 Čeleď: *Albatrelaceae* (krásnoporkovité)  
     Druh: *Albatrellus confluens* (Alb. Et Schwein. Fr.) (krásnoporka žemlička)  
 Čeleď: *Hapalopilaceae* (hlinákovité)  
     Druh: *Lasiochlaena benzoina* (Wahlenb.) Pouzar (smolokorka pryskyřičná)
- Řád: *Russulales* (holubinkotvaré)  
 Čeleď: *Auriscalpiceae* (lžičkovcovité)  
     Druh: *Clavicornia pyxidata* (Pers.:Fr.) Doty (korunokyjka svícnovitá)  
 Čeleď: *Russulaceae* (holubinkovité)  
     Druh: *Lactarius deliciosus* (L.) Gray (ryzec pravý)  
           *Lactarius chrysorrheus* Fr. (ryzec zlatomléčný)  
           *Lactarius picinius* Fr. (ryzec smoločerný)  
           *Lactarius salmonicolor* R. Heim Leclair (ryzec lososový)  
           *Russula ochroleuca* Pers. (holubinka hlínožlutá)  
           *Russula rosea* Pers. (holubinka sličná)

Říše: *Fungi* (houby)  
Oddělení: *Eumycota* (pravé houby)  
Pododdělení: *Ascomycotina* (houby vřeckaté)  
Třída: *Ascomycetes* (houby vřeckovýtrusé)  
Řád: *Pezizales* (kustřebkotvaré)  
Čeleď: *Discinaceae* (desticovitě)  
Druh: *Gyromitra infula* (Schaeff.: Pers.) Quél. (ucháč čepcovitý)

### 3.2.2. Morfologická charakteristika a výskyt jednotlivých taxonů

**Rod: *Boletus* (hřib)**

Druh: *Boletus impolitus* Fr. (hřib plavý)



Obr. 4: *Boletus impolitus* Fr. (autor Václav Hanzlík, in Zicha 2011).

Klobouk je v průměru 5 - 25 cm, hnědé nebo žlutohnědé barvy. Velmi často je vrásčitý, vláknitý nebo hrbolkatý. Rourky citrónové až zlatožluté barvy mívají ve stáří zelený nádech. Poraněním barvu nemění. Třeň tlustý, břichatý, někdy až kyjovitý, u vrcholu zrníkatý, dole jemně vláknitě šupinatý. Barva třeně je nažloutlá až citrónově žlutá, v mládí často s červeným nádechem. Dužnina je na řezu nažloutlá, pouze v bázi jemně načervenalá. Chuť houby je nasládlá, vůně nakyslá, ve stáří až karbolová. Roste od června až do září v dubohabrových hájích, světle listnatých parcích a lesích. Dává přednost nižším polohám a vápenitým půdám. Jde o jedlou houbu (Zicha et al., 2011).

**Rod: *Boletus* (hřib)**

**Druh: *Boletus luridiformis* Rostk. (hřib kovář)**



Obr. 5: *Boletus luridiformis* Rostk. (autor Jiří Laštůvka, in Zicha 2011).

Klobouk má v průměru 6 - 20 cm. Tvar klobouku je polokulovitý, pak vyklenutý až oploštěle polštářovitý, sametový, suchý, stářím a pomačkáním šedě černající. Barvou tmavohnědý až černohnědý, někdy s olivovým nádechem. Rourky jsou žlutozelené, pomačkáním zelenají nebo modrají. Póry jsou nejprve žluté, brzy však krvavě zčervenají, stářím blednou do olivova, pomačkáním rychle tmavě modrají. V mládí je tvar třeně soudkovitý, poté kyjovitý až válcovitý, v dolní polovině vždy rozšířený. Nahoře a uprostřed je žlutý, dole má barvu nazelenalou. Třeň je pokryta drobnými nachovými, nebo karmínově červenými šupinkami, vzbuzuje dojem tečkování. Nejpodnější část třeně je pokryta povlaky jemného bílého podhoubí. Otláčená místa modrozelenaví. Dužnina je pevná, žlutá, za vlhka připomíná mramorování. Na řezu ihned intenzivně modrá. Chuť hříbu kováře je jemná, vůně příjemná, houbově nakyslá. Vyskytuje se od května do října v jehličnatých i listnatých lesích, kyselých květnatých bučinách, jedlobučinách, horských smrčinách, druhotně smíšených lesích s nevápennou půdou. Hřib kovář je jedlý – je zde však nutné delší tepelné zpracování, syrový nebo nedovařený může způsobit trávicí obtíže (Zicha et al., 2011).



**Rod: *Gomphidius***

**Druh: *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr. (slizák skvrnitý)**



Obr. 6: *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr. (Opletal a Koula, 2011).

Klobouk je široce kuželovitý, v dospělosti až plochý, slizký, masově hnědý, na otlačených místech černohnědě skvrnitý. Okraj klobouku je tenký, zrnitý a zahnutý, zvlněný. Lupeny jsou sbíhavé, špinavě bílé, po poranění se na nich tvoří hnědočervené až hnědé skvrny. V raném stádiu rozeznatelný závoj, který brzy mizí a ve stáří chybí. Třeň je válcovitý, bílý až žlutavý na bázi žlutý až šafránový, v mládí s červenavými kapkami, které vytvářejí po zaschnutí tmavě hnědé žíhání. Narozdíl od klobouku není třeň slizký. Bělavá dužnina na řezu červená. Výtrusný prach je olivově černavý. Roste dost vzácně, pod modřínou, na nepřiliš kyselých půdách. Vyskytuje se od července do října. Houba je jedlá (Antonín, 2006, Hagara et al., 2006, Grünert a Grünert, 2005).

**Rod:** *Leccinum*

**Druh:** *Leccinum griseum* (Quél.) Singer (kozák habrový)

**Synonyma:** *Leccinum carpini*, *Boletus scaber*, *Boletus griseus*  
(Bielli, 2001)



Obr. 7: *Leccinum griseum* (Quél.) Singer (autor Jiří Čepelák, in Zicha 2011).

Klobouk je červenohnědý až černavý s průměrem 3 - 12 cm. Pokožka klobouku je u mladých hub jamkovitá, později rýhovaná, dolíčkovitě rozpraskaná. S přibývajícím zralostí se klobouk stahuje, takže rourky na jeho okraji jsou nekryté. Rourky a póry jsou nejprve krémové, později šedavé. Třeň je nahoře užší a má žebrovitý až dlouze vláknitý povrch, který je nejprve pokryt šedavými až černými bradavičkami. Bílá dužnina je v klobouku měkká, ve třeni tuhá a vláknitá. Na vzduchu se dužnina barví zpočátku růžově, později šedne až černá. Doba výskytu je od června do října v listnatých lesích, především pod habry, topoly, břízami a lískami. Vyskytuje se někdy i pod duby a buky. Kozák habrový je jedlá houba, i když ne vysoké kvality (Bielli, 2001).

**Rod: *Gyromitra***

Druh: *Gyromitra infula* (Schaeff.: Pers.) Quél (ucháč čepcovitý)

Synonymum: *Helvella infula* (Kothe, 2007)



Obr. 8: *Gyromitra infula* (Schaeff.: Pers.) Quél. (autor Miroslav Junek, in Zicha 2011).

Průměr klobouku 3 - 8 cm, barvy hnědé až červenohnědé. Klobouk je rozdělený na laloky, které velmi často vybíhají ve tři špičaté cípy. Dužnina je velmi křehká, bílá nebo načervenalá. Třeň je žlutavě nebo masově zabarvený, dlouhý 3 - 5 cm a silný 1 - 1,5 cm. Povrch je hladký, ve stáří často dutý. Jedná se o vzácný druh rostoucí od září do listopadu především v jehličnatých lesích. Často roste na pařezích, spáleništích. Jedná se o jedovatou houbu (Kothe, 2007).

**Rod: *Albatrellus***

Druh: *Albatrellus confluens* (Alb. Et Schwein. Fr.)

(krásnoporka žemlička)



Obr. 9: *Albatrellus confluens* (Alb. Et Schwein. Fr.) (autor Zdeněk Svrček, in Zicha 2011).

Plodnice tvoří srostlé laločnaté trsy, někdy až v průměru 1 metr, tvořené z klobouků 3 - 8 cm širokých. Klobouky mohou být okrově žluté až načervenalé. Spodní část klobouku tvoří bílé, velmi husté, nízké rourky, které se sbíhají v bílý třeň. Dužnina je bílá, křehká, šťavnatá. Výtrusný prach je bílý. Roste od srpna do září v jehličnatých, především smrkových lesích na kyselém podkladu. Krásnoporka žemlička je jedlá houba (Svrček, 1996).

**Rod: *Lasiochlaena***

Druh: *Lasiochlaena benzoina* (Wahlenb.) Pouzar

(smolokorka pryskyřičná)

Synonymum: *Ischnoderma benzoinum* (Keizer, 2005)



Obr. 10: *Lasiochlaena benzoina* (Wahlenb.) Pouzar (Opletal a Koula, 2011).

Plodnice je jednoletá, plochá, střehevité až vějířovitá. Rozměry klobouku jsou asi 4 - 20 x 3 - 15 cm, barva je tmavě kaštanová, ve stáří až černohnědá. Svrchu je klobouk zvlněný, vrásčitý, drsný až plstnatý se zvlněným, bělavým až žlutohnědým okrajem. Rourky jsou dlouhé, světle okrové a póry okrouhlé, bílé až okrové, dotekem hnědnoucí. Dužnina je světle okrová, šťavnatá. Parazituje na pařezech a kmenech jehličnatých stromů, velmi vzácně i listnatých (Keizer, 2005).

**Rod: *Clavicornora***

Druh: *Clavicornora pyxidata* (Pers.:Fr.) Doty (korunokyjka svícnovitá)

Synonymum: *Artomyces pyxidatus* (Pers.) (Antonín, 2006).



Obr. 11: *Clavicornora pyxidata* (Pers.:Fr.) Doty (autor Lucie Hederová, in Zicha 2011).

Plodnice jsou vysoké, křehké, bohatě rozvětvené, na vrcholu miskovitě rozšířené, na okrajích s prstovitými špičkami, žluté až žlutohnědé barvy. Roste hojně, jednotlivě nebo ve skupinách na rozkládajícím se dřevě listnáčů, především topolů, habrů, dubů, buků, méně často jehličnanů (borovic a jedlí). Vyskytuje se od června až do září a je nejedlá (Antonín, 2006, Hagara et al., 2006).

**Rod: *Lactarius***

Druh: *Lactarius deliciosus* (L.) Gray (ryzec pravý)

Synonymum: *Agaricus deliciosus* (Bielli, 2001)



Obr. 12: *Lactarius deliciosus* (L.) Gray (autor Miroslav Junek, in Zicha 2011).



Klobouk je asi 3 - 8 cm široký, uprostřed vmáčklý, na okrajích podvinutý, hladký, lysý. Barva klobouku se mění od okrově žluté k tmavě oranžové, starší houby mají zelené skvrny. Lupeny jsou dost husté, světle červenohnědé, poraněním zelenající. Třeň je válcovitý, zpočátku vyplněný dužninou, později dutý. Na povrchu třeně jsou tmavě zabarvené jamky. Dužnina je ve třeni křehká, obsahuje oranžové až červené mléko, které při zasychání bledne až zelená. Roste od srpna až do října výhradně pod borovicemi (tvoří s nimi mykorrhizu), často na alkalických, písčitých půdách. Ryzec pravý je jedlá, velmi chutná houba. Vůně je ovocná a chuť svíravá (Bielli, 2001, Svrček, 1996, Læssøe, 2004).

**Rod: *Lactarius***

Druh: *Lactarius chrysorrheus* Fr. (ryzec zlatomléčný)



Obr. 13: *Lactarius chrysorrheus* Fr. (Opletal a Koula, 2011).

Klobouk je asi 4 – 6 cm široký, uprostřed vmáčklý, okraj hlavně mladších jedinců je podvinutý. Nejprve je pleťově růžový, pak žemlově oranžový, přičemž tmavší kruhy jsou obzvlášť zřetelné směrem k okraji. Pokožka klobouku je matná a lysá. Lupeny jsou husté, větvené, ne příliš široké. Třeň válcovitý, později dutý, nažloutlý, odspodu s oranžovým nádechem. Dužnina je křehká, obsahuje bílé palčivé mléko, které na vzduchu žloutne. Výtrusný prach je světle žlutý. Chuť palčivá. Doba výskytu je od července do září. Jde poměrně o hojnou houbu, která se vyskytuje v listnatých nebo smíšených lesích, většinou pod duby. Ryzec zlatomléčný je nejedlá houba (Svrček, 1996, Bielli, 2001).

**Rod: *Lactarius***

Druh: *Lactarius picinus* Fr. (ryzec smoločerný)



Obr. 14: *Lactarius picinus* Fr. (autor Jindřich Poříz, in Zicha 2011).

Klobouk je hladký, barvy tmavohnědé, sépiově nebo olivově hnědé, na okraji někdy světlejší. Lupeny jsou krátké, světle okrové. Třeň je nahoře bělavý, jinde zbarvený stejně jako klobouk. Chuť mléka je po chvíli výrazně palčivá. Roste ve smrčinách v podhorských a horských polohách. Můžeme se s ní setkat od srpna do října. Ryzec smoločerný je nejedlou houbou (Antonín, 2006).

**Rod: *Lactarius***

Druh: *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair (ryzec lososový)



Obr. 15: *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair (autor Stanislav Krejčík, in Zicha 2011).

Klobouk je vyklenutý až nálevkovitý, masitý, slizký, lesklý a vrásčitý. Barva klobouku je žlutooranžová, při okraji s několika úzkými pásy, které nevybledávají. Po otláčení se klobouk mění do hnědě vínové barvy. Lupeny jsou široce připojené, světle okrové až oranžově okrové, ve stáří na poraněných místech zeleně skvrnité. Třeň je válcovitý dřukovaný, zbarvený jako klobouk. Dužnina má mýdlový pach a roní mléko, které má trvale oranžově červenou barvu. Doba výskytu je od srpna do října. Roste v jehličnatých lesích pod smrky, na křemitých podkladech. Je jedlá (Erhart et al., 1977, Antonín, 2006).



**Rod: *Russula***

Druh: *Russula ochroleuca* Pers. (holubinka hlínožlutá)

Klobouk je asi 5 - 10 cm široký, s vmáčklým středem, matný, okrový až žlutý, někdy také s olivově zeleným nádechem.



Obr. 16: *Russula ochroleuca* Pers. (Opletal a Koula, 2011).

Má hladký, později rýhovaný okraj. Lupeny jsou široké, smetanové barvy. Třeň je válcovitý nebo úzce kyjovitý, bílý až bělavý, ve stáří zašedlý. Dužnina bílá, stářím šedne. Výtrusný prach je bělavý až světle smetanový. Chuť je mírná až štiplavá. Roste hojně ve smrkových a borovicových lesích, především v podhorských polohách, v období srpen až září. Houba je nejedlá (Keizer, 2005, Svrček, 1996).

**Rod: *Russula***

Druh: *Russula rosea* Pers. (holubinka sličná)



Obr. 17: *Russula rosea* Pers. (autor Stanislav Jirásek, in Zicha 2011).

Klobouk 5 - 12 cm v průměru, sklenutý až rozložený, s vmáčklým středem, hladký, suchý, tvrdý, růžově červený až červený. Lupeny jsou krátce připojené, částečně rozvětvené, bílé až světle žluté, při okraji klobouku červené a zaoblené.

V mládí poměrně pružné, ve stáří křehké. Třeň je vločkatý, tlustý, tvrdý, válcovitý, vrásčitý, bílý, někdy růžově ochmýřený. Dužnina bílá, pod pokožkou klobouku načervenalá. Výtrusný prach smetanově nažloutlý. Vůně houby je nevýrazná, chuť hořká. Vyskytuje se od července až do října pod listnatými stromy, na vápenitém písku a jílu. Je jedlá (Keizer, 2005, Zicha et al., 2011).

### **3.3. Chemická stavba hub**

Voda a 3 základní skupiny živin – bílkoviny, sacharidy, lipidy – jsou nejvíce zastoupenými složkami nejen hub, ale všech biologických materiálů. Tyto živiny vznikají syntézou z jednodušších látek, nízkomolekulárních organických složek. Kromě toho je v buňce ještě asi 20 jiných typů nízkomolekulárních sloučenin, které se nepodílejí na výstavbě makromolekul, ale mají katalytický význam v kombinaci s enzymy. Houby obsahují kolem 90 % vody a sušiny jen asi 10 % (Klán, 1989, Kalač 2008).

Jak uvádí Kalač (2008), je z hlediska výživy příznivé vysoké zastoupení vlákniny, tvořené zejména chitinem. Nízká energetická hodnota je určována nízkým obsahem sušiny a malým zastoupením tuků, z toho plyne, že houby nepředstavují významnější zdroj esenciálních nenasycených mastných kyselin (MK) ani nežádoucích kyselin mastných. Význam pro lidskou výživu mohou mít vitamíny a minerály, které jsou v houbách zastoupeny v nižším měřítku než uvedené základní živiny. Víme jen velmi málo o chemických formách a biologické využitelnosti jednotlivých složek hub. Využitelnost je však zřejmě nižší než ze zeleniny vzhledem k přítomnosti nestrávitelného stavebního polysacharidu chitinu, který omezuje stravitelnost jiných látek. Jeho výhoda tkví ve snížení rizika nežádoucích složek, jako jsou těžké kovy nebo radioaktivní látky. Na druhou stranu se tímto omezuje již vžitě tvrzení, že jsou houby bohatým zdrojem bílkovin, stopových prvků a vitamínů.

Důležitými obsahovými látkami jsou přímé produkty metabolismu, tzv. sekundární metabolity. Jde o chemicky velmi rozmanitou skupinu látek. Sekundární metabolity mají význam jak na poli toxikologickém, tak v oblasti humánní a veterinární medicíny. Zkoumáním sekundárních metabolitů zatím neanalyzovaných

druhů hub se nabízí možnost nalezení nové chemické substance, a tudíž představují houby velmi perspektivní skupinou v rozvoji nových léčiv.

Většina dostupných údajů o obsahových složkách jsou uváděna pro syrový stav houby. Věrohodných údajů o změnách jednotlivých složek hub během skladování, kuchyňských úprav, konzervace je pořád velmi málo (Kalač, 2008).

### **3.3.1. Primární metabolity**

#### **Sacharidy**

##### Monosacharidy a oligosacharidy hub

Podstatnou část houbové sušiny tvoří cukerný alkohol mannitol, který má podíl na objemovém růstu plodnice a zpevňuje zejména třeň. Z monosacharidů výrazně převažuje glukóza. Během skladování hub obsah glukózy a glykogenu klesá. Pro houby je typický transportní disacharid trehalóza, tzv. houbový cukr. Společně s cukernými alkoholy plní mnoho biologických funkcí jako je udržení osmotického tlaku nebo schopnost regulovat intracelulární hladinu koenzymů. Trehalóza se nachází pouze v mladých plodnicích a později mizí. Podobně jako u bílkovin, došlo při vaření hub k vysokému poklesu obsahu trehalózy i mannitolu, zatímco sušení a zmrazení vyvolalo jen nepatrné úbytky (Kalač, 2008, Kovář, 1999, Klán, 1989).

##### Glykogen

Stejně jako u živočichů je i u hub zásobním polysacharidem glykogen. Jde o látku člověkem běžně přijímanou v mase, proto jeho přítomnost v houbách nepředstavuje z hlediska lidské výživy žádný zvláštní přínos (Kalač, 2008).

##### Chitin a další stavební polysacharidy

Základní složkou buněčných stěn hub jsou stavební polysacharidy. Mezi nejdůležitější patří chitozan, chitin, polygalakturonová kyselina a galaktany. Jejich úkolem je udržovat pevnost. Jsou důležitým zdrojem vlákniny, na druhé straně snižují využitelnost některých živin a minoritních složek jako jsou vitamíny a stopové prvky. Chitin je typickým stavebním polysacharidem, jež se nevyskytuje v rostlinné říši, za to ho můžeme nalézt v říši živočišné. (Kalač, 2008, Klán, 1989).

## **Tuky**

Celkový obsah lipidů v houbové sušině je asi 2 - 6 %. Lipidy hub můžeme rozdělit na neutrální a polární. Neutrální jsou tvořeny jednoduchými tuky, především triacylglyceroly (TAG) a polární tvořené složenými lipidy, nejčastěji fosfolipidy s převažujícími glycerolfosfatidy. Neutrální lipidy slouží především jako zásobárna a zdroj energie, zatímco polární lipidy plní funkci stavebních složek, jež se podílí na vlastnostech buněčných membrán. Vyšší mastné kyseliny (VMK) v lipidech hub jsou nejčastěji jednosytné s přímým uhlíkovým řetězcem, se sudým počtem uhlíků a zároveň je počet uhlíků vyšší jak deset. Řetězec je nasycený nebo obsahuje dvojné vazby. Pro houby je charakteristické cis uspořádání na všech dvojných vazbách. V zastoupení VMK převládají kyselina olejová, linolová a kyselina palmitová. Při studiích několika druhů hub bylo prokázáno, že hlavním fosfolipidem je fosfatidylcholin (lecitin). V houbách jsou také přítomny tzv. mykosteroly, z nichž nejrozšířenější je ergosterol, který v houbách zaujímá 60 - 70 % všech sterolů. Z dalších více zastoupených látek této skupiny jsou fungisterol a ergosta-7,5-dienol (Kalač, 2008).

## **Bílkoviny**

Nejen v houbách, ale obecně v biologickém materiálu převládají bílkoviny, přítomnost volných aminokyselin (AMK) a peptidů je nízký. Rostliny a houby narozdíl od živočichů dokáží syntetizovat základní AMK a z nich bílkoviny. Zastoupení esenciálních AMK v bílkovinách hub je výživově příznivé, lepší než ve většině rostlinných bílkovin (Kalač, 2008).

Klán (1989) ve své knize poukazuje na fakt, že u hub dochází narozdíl od jiných organismů k odlišné syntéze AMK lyzinu. Většina hub vychází při syntéze z kyseliny ketoglutarové, zatímco plísňe, bakterie a vyšší rostliny z kyseliny asparagové. Tento rozdíl v biosyntéze předpokládá, že se houby oddělily od ostatních eukaryotních organismů v časném stádiu evoluce.

## **Enzymy**

Jsou bílkoviny, které katalyzují pochody probíhající nejen v houbách, ale obecně v živé hmotě. U hub jsou výrazné především účinky enzymů, jež se podílí na

rozkladu odumřelých organismů. Stávají se tak nezbytným článkem pro neustálý přírodní cyklus. Enzymy lze získat z mycelia pěstovaných hub, ale je možné je také zkoumat u hub volně rostoucích (Kalač, 2008).

### **Vitamíny**

Z hlediska výživy lze za poměrně vysoký obsah považovat vitamín B<sub>2</sub>, a vitamín D<sub>2</sub>, resp. jeho provitamín (ergosterol). U veganů a vegetariánů může nedostatek vitamínu D<sub>2</sub> zapříčinit poruchy hospodaření s vápníkem, zejména osteoporózu. Pro tyto rizikové skupiny osob mohou být houby zdrojem jak vitamínu D<sub>2</sub>, tak jeho provitamínu. Osvětlené části hub obsahují více vitamínu D<sub>2</sub> než části zastíněné. Jak se ukázalo, intenzita osvětlení je významnější než stáří plodnice. Tepelnou úpravou dochází k částečné ztrátě vitamínu C. Naproti tomu se žádné jiné vitamíny neničí (Kalač, 2008, Mikulcová, 2006).

### **3.3.2. Sekundární metabolity**

#### **Vonné látky**

Stovky různých chemických sloučenin mají na svědomí tuto charakteristickou vlastnost – vůni. Dosud známé vonné látky se člení na těkavé a netěkavé. Netěkavé látky ovlivňují vnímání vůně v kombinaci s chuťovými vjemy při konzumaci hub. Těkavé látky můžeme zařadit do několika různých skupin (deriváty oktanu a oktenu, nižší terpeny, benzaldehyd a příbuzné látky sirné sloučeniny a další jiné) (Kalač, 2008).

#### **Barviva**

Barevná pestrost hub je způsobena chemickými látkami – pigmenty. Přesný biologický význam pigmentace zatím nebyl plně objasněn. Někteří ji považují za odpadní produkty metabolismu. Ukazuje se však, že některé pigmenty mohou plnit funkci přenašečů vodíku při dýchacích pochodech, chránit před UV zářením nebo dokonce vykazovat antibiotický účinek. Míra zabarvení je ovlivněna stářím plodnice, intenzitou světla a teplotou. Houby s výrazně zabarvenou plodnicí rostou na zastíněných místech, zatímco plodnice s barvou nevýraznou, světle hnědou nebo

bílou se vyskytují na místech prosvětlených. Pozornost vzbuzují houby, které mění barvu plodnice mechanickým poškozením. Z chemického hlediska se vesměs jedná o oxidaci fenolových látek hub vzdušným kyslíkem (Kalač, 2008, Klán, 1989).

### Izolované sekundární metabolity z testovaných druhů hub

U druhů *Boletus luridiformis* Rostk., *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quél., *Lactarius picinus* Fr., *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair, *Lasiochlaena benzoina* (Wahlenb.) Pouzar, *Leccinum griseum* (Quél.) Singer a *Russula rosea* Pers. zatím nebyly izolovány čisté látky. U druhu *Boletus impolitus* Fr. byly detekovány alkaloidy, které zatím nebyly blíže specifikovány (Bastida et al., 1987).

Doposud izolované látky ve zkoumaných druzích (rodech) jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Izolované látky zkoumaných druhů.

| ROD / druh                   | indikované látky   | zdroj  |
|------------------------------|--|--|
| <i>Albatrellus confluens</i> | 5-methoxy-3,6-bis(phenylmethyl)- 2(1H)-pyrazinon   | Kawagishi et al. (1996)  |
|                              | Prenylovaný resorcinol – albakonol   | Q.Liu et al. (2008); Hellwing (2003)                                 |
|                              | Grifolin   | Mao Ye et al. (2007); Hellwing (2003); Hirosuke Misasa et al. (1992) |
|                              | Neogrifolin  | Hellwing (2003); Misasa et al. (1992); Yang et al. (2008)            |
|                              | Konfluentin; schtigeral  | Hellwing (2003)  |
|                              | Dimerický meroterpenoid (+)–(R)-grifolinon C; albatrellin; grifolinon A,B  | Yang et al. (2008)   |
|                              | Polyenový pyron – aurovertin E   | Wang et al. (2005); Zhou et al. (2009)                               |
|                              | Kleistanthanový typ diterpenů – kys. 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\beta$ -trihydroxykleistanth-13(17),15-dien-18-ová | Zhou et al. (2009)   |
|                              | 8 $\beta$ -hydroxy-18-norkleistanth-4(5),13(17),15-trien-3-on  |  |
|                              | Isokumariny – 3R-(2R-hydroxypropyl)-8-hydroxyl-7-methyl-3,4-dihydroizokumarin                                      |  |
|                              | aurovertin B, C  |  |
|                              | Polyestery – orbuticin; BK223A; BK223B; 15G256a-2-me   |  |
|                              | Isokumarin – 3R-6-hydroxymellein   |  |

Tab. 2 (pokračování): : Izolované látky zkoumaných druhů.

|                               |  |  |
|-------------------------------|--|--|
| <i>Clavicornia</i> sp.        | Seskviterpeny – kys. klavikoronová; divarikateny A, B;   | Zheng et al. (2008)                      |
|                               | 7-epitsugikolin H, M   |  |
|                               | Nesekviterpeny – tsugikolin L  |  |
| <i>Clavicornia pyxidata</i>   | Seskviterpeny – pyxidatol A, B, C; tsugikolin E; omphadiol   | Zheng et al. (2008)                      |
|                               | Seskviterpenoidy – klavikorolidy A, B; tsugikoliny H, A, C; sterpurany; laktarofurin A   | Zheng a Shel (2009)                      |
|                               | Kyselina klavikoronová   | Erkel a Anke (1991)                      |
| <i>Gomphidius maculatus</i>   | 2,2',4,4',5,5'-hexahydroxybifenyl  | Jaegers et al. 981)                      |
|                               | Červený pigment–gomfilakton  |  |
|                               | 1,2,4-trihydroxybenzen   | Von Ardenne a Steglich (1974)            |
| <i>Lactarius</i> sp.          | Seskviterpeny – guaiany, marasmany, izolaktarany, drimany, laktarany, sekolaktarany  | Ayer a Trifonov (1994)                   |
|                               | Aromatické sloučeniny – 2,2-dimethylchromen; 6-methoxy-2,2-dimethylchromen a jejich deriváty   |  |
|                               | Estery isoprenylovaného hydrochinonu   |  |
|                               | Azulenové seskviterpeny  |  |
| <i>Lactarius deliciosus</i>   | Kys. anofinová; chroman-4 on; hydroxyacetylindol; cyklické dipeptidy; ergosterol; směs mastných kyselin  | Ayer a Trifonov (1994)                   |
|                               | Cyklo-Pro-Val; indol-3-karboxyaldehyd; cyklo-Pro-Leu   | Yang et al.(2006)                        |
|                               | Azulenové pigmenty – 7-(1,2-dihydroxy-1-methylethyl)-4-methylazulen-1- karbaldehyd; 7-acetyl-4-methylazulen-1-karbaldehyd; 4-methyl-7-(1-methylethenyl)azulen-1-karbaldehyd  |  |
|                               | Dihydro-azulen alkohol a jeho ester s kyselinou stearovou; laktarofulven; aromatické sloučeniny  |  |
|                               | Kyselina p-hydroxybenzoová   | Barros et al. (2009)                     |
|                               | Deterol  | Hrdina et al. (2004)                     |
|                               | Guainový seskviterpen laktaroviolin  | Yang et al. (2006); Hrdina et al. (2004) |
| <i>Lactarius chrysorrheus</i> | Laktaroskopichlid A; blennin C; laktardial; furanol; chysorrhelakton; chysorrhedral; chysorrhéal   | De Bernardi et al. (1993)                |
| <i>Russula ochroleuca</i>     | Chromogenické meroterpenoidy-ochroleucin A, B  | Sontag et al. (2006)                     |
|                               | 1-O-β-D-glukopyranosyl-(2S,3R,4E,8E,2'R)-2-N-(2'-hydroxypalmitoyl)-9-Me 4,8- sfingadienin (cerebrosid B), 1-O-β-D-glukopyranosyl-2-N-(2'-hydroxyoktadekanoyl)-9-methyl-4,8-sfingadienin (cerebrosid D), 5α,8α-epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3β-ol, (22E,24R)-ergosta-7,22-dien-3β-ol, (24S)-ergosta-7-en-3β-ol, uracil, adenin, anhydrid kyseliny thiooctové, ethyl-β-D-glukopyranosid, D-allitol a stearová kyselina | Gao et al. (2001)                        |

### 3.3.3. Minerální látky

Minerální látky můžeme rozdělit podle míry jejich zastoupení na makroelementy (vápník, hořčík, sodík, draslík, fosfor, chlor a síra) a stopové prvky, tzv. mikroelementy.

**Na** – obsah sodíku je obvykle vyšší než v řadě druhů zeleniny.

**K** – není rozložen v plodnici rovnoměrně. Obsah klesá v pořadí klobouk, třenň, výtrusorodá vrstva a výtrusy. Množství draslíku v těle houby byl 20x až 40x vyšší než v půdě, na které houba rostla. To svědčí o vysoké schopnosti plodnice zadržovat tento prvek.

**Ca** – nejvyšší obsah vápníku byl nalezen v třeni. Na rozdíl od draslíku nebyla u plodnice hub nalezena schopnost kumulovat tento prvek. Obsah vápníku v houbách je nižší než u většiny druhů zeleniny.

**Mg** – tento prvek není v plodnicích zadržován, jeho obsah byl často nižší než v substrátu, z něhož houba přijímala živiny. Nebyly nalezeny razantní rozdíly v obsahu hořčíku mezi starými a mladými plodnicemi.

**P** – houby kumulují tento prvek ze substrátu, ve kterém rostou. Jeho množství je vyšší než u většiny potravin rostlinného a živočišného původu. Není však dosud známo, v jaké chemické formě je fosfor vázaný (Kalač, 2008).

## 3.4. Antioxidační aktivita

### 3.4.1. Volné radikály (VR)

Volné radikály jsou látky, které mohou existovat samostatně a obsahují alespoň jeden nepárový elektron. Vznikají z normální částice ztrátou nebo přijetím elektronu. Volný elektronový pár se snaží získat elektron a mít tak stabilní konfiguraci. Z toho vyplývá vysoká reaktivita a současně malá stabilita volných radikálů. Často je tento chybějící elektron získán vytržením ze zdravé molekuly, ze které se pak stává radikál. Tento radikál může atakovat jinou sloučeninu a nastartovat tak řetězovou reakci vedoucí k poškození dalších molekul (Racek, 2003, Youngson, 1995). Není tomu ovšem tak vždy, jak uvádí ve své knize Štípek (2000).



Nejčastěji se setkáváme s volnými radikály kyslíku. Nejběžnější je superoxidový radikál  $O_2^{\bullet}$ , který vzniká redukcí jednoho elektronu molekuly kyslíku. Nejnebezpečnější je hydroxylový radikál  $^{\bullet}OH$ . Látky, které nemají nepárový elektron (kyselina chlorná, peroxid vodíku) a jsou spojené s metabolismem kyslíkových radikálů, se společně s volnými radikály nazývají reaktivními formami kyslíku (ROS). Ty se mohou účastnit přeměny energie, která je nezbytná pro životní procesy. Dále pak se mohou účastnit enzymových mechanismů a podílet se na činnosti buněčného informačního systému, kde plní funkci signálních molekul. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole. Existují i radikály, jejichž volný elektron patří jinému atomu než kyslíku, nejčastěji se jedná o atom dusíku. Hlavním představitelem je  $^{\bullet}NO$ . I ten může poskytovat celou řadu jiných sloučenin typu VR i bez nepárového elektronu, v tomto případě zahrnované pod pojmem reaktivní formy dusíku (RNS). Atomy přechodných kovů (nikl, mangan, titan, železo, aj.) katalyzují vznik volných radikálů. Z elektrochemického hlediska je ztráta elektronu oxidací, proto lze VR označit jako látky s oxidačním účinkem (Racek, 2003, Štípek, 2000).

### 3.4.2. Vznik volných radikálů

Velké množství radikálů vzniká během metabolismu nebo se do těla dostávají zvenčí.

Příčiny exogenní: např. kouření, vysoký obsah škodlivin, intoxikace chemickou látkou, ionizující záření, nadměrné vdechování kyslíku v jeho čistém stavu nebo také potravou.

Možné endogenní příčiny: hyperglykémie, syntéza prostaglandínů, vznik kyseliny močové, zvýšený metabolismus estrogenů, rozpad fagocytů a makrofágů, vznik methemoglobinu, aj. (Racek, 2003, Youngson, 1995).

### 3.4.3. Ochrana před volnými radikály

Jelikož VR odebírají molekulám elektron, působí oxidačně. Látky, které zabraňují jejich oxidačnímu působení, jsou souhrnně nazývány jako **antioxidanty (AO)**. Antioxidanty jsou rozdělovány na umělé a přirozené. Do **přirozených AO** řadíme látky, které jsou organismem produkovány nebo jsou přijímány v potravě:

vitamíny, aminokyseliny, polyfenolické bioflavonoidy, koenzym Q10, estrogeny a některé další steroidy, selen, germanium, zinek, kyselina alfa lipová, karoteny. Z látek produkovaných samotným organismem jde mimo jiné např. o enzym superoxid dismutázu, který přeměňuje VR na méně nebezpečný peroxid vodíku. Peroxid vodíku je dále organismem přeměňován pomocí enzymu katalázy nebo glutathion peroxidázy na vodu (Racek, 2003, Youngson, 1995, Ortenbergová, 2002).

Přírozně vyskytujícím se antioxidantům je věnována pozornost v biologickém výzkumu, medicíně, farmacii a technologii potravin. V poslední dekádě byl proveden rozsáhlý výzkum rostlin jako zdroje sloučenin, které odbourávají volné radikály (Polášek et al., 2004).

Do **umělých** AO zařazujeme celou řadu léků a také látek přírodních, které jsou modifikovány a získávají tak jiné požadované vlastnosti (Racek, 2003).

#### **3.4.4. Rovnováha mezi antioxidanty a volnými radikály**

Za normálních okolností existuje v těle rovnováha mezi VR a antioxidanty. Převaha jedné ze složek může znamenat poškození organismu. Převaha volných radikálů se označuje jako **oxidační stres**. Někdy může nastat i paradoxní situace, kdy převaha antioxidantů může umocňovat oxidační stres, anebo blokovat volné radikály, jež jsou nezbytné pro organismus (Racek, 2003).

#### **3.4.5. Nemoci způsobené přítomností volných radikálů**

Volné radikály někdy mohou stát za vznikem onemocnění, jindy zhoršují nebo komplikují jeho průběh. Onemocnění, v jejichž etiopatogenezi hrají roli VR, jsou např. infarkt myokardu, ateroskleróza, artritida, cukrovka, tumor, zánětlivé procesy, neurologické a oční choroby, onemocnění trávicího traktu nebo také při selhávání ledvin.

Existuje teorie, podle které se můžeme domnívat, že za procesem stárnutí stojí hlavně VR. Podle ní jsou tyto látky v daleko větším měřítku produkovány právě u starších osob (Racek, 2003, Youngson, 1995).

### 3.4.6. Stanovení antioxidační aktivity

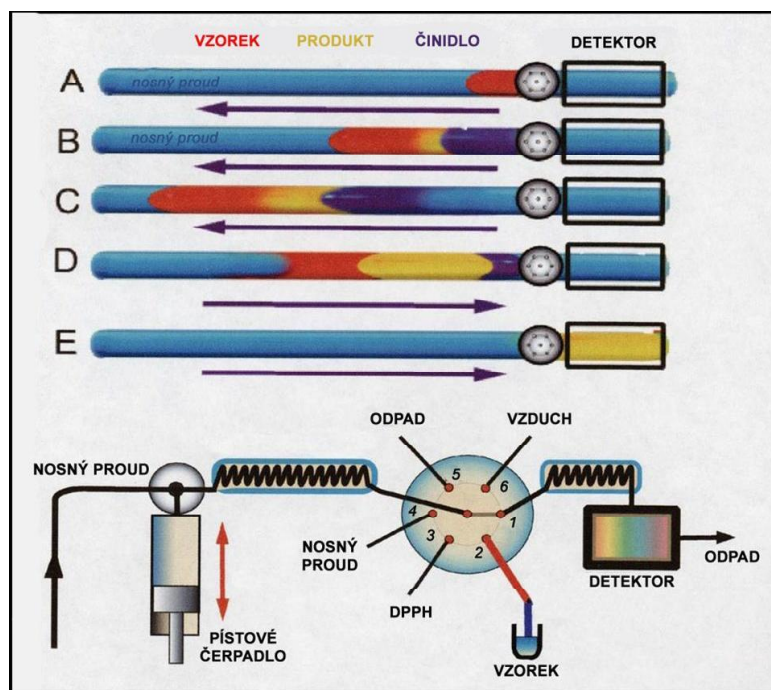
Podle Poláška a kol. (2004) bylo vyvinuto několik detekčních systémů založených na redoxních reakcích, jako např. inhibice chemiluminiscence luminolu nebo tetralinu, inhibice tvorby thiokyanátu železitého, odbarvení  $\beta$ -karotenu, odbarvení 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny), odbarvení 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH radikál), aj.

A například odbarvení DPPH radikálu, jež je způsobené reakcí s antioxidanty v organické nebo vodně-organickém roztoku, může být jednoduše následováno spektrofotometrií vzorku. Dávkové zpracování posledně zmíněné metody neumožňuje screening velkých sérií rostlinných vzorků, protože je časově velice náročná (standardní reakční čas je 16 až 30 minut). Ačkoliv některé poslední články zmiňují vylepšení této metody, tak analýza extraktu jedné rostliny zabere 30 minut, což je při zpracování většího počtu vzorků nepraktické. Naproti tomu automatizovaná DPPH metoda založená na sekvenční injekční analýze (SIA) je velice vhodná pro rychlé testování antioxidační aktivity velkých sérií rostlinných extraktů (Polášek a kol., 2004).

### 3.4.7. Sekvenční injekční analýza (SIA)

Jak uvádí Polášek a kol. (2004), tak počítačově řízený systém sekvenční injekční analýzy (SIA) vybavený spektrofotometrickým diodovým detektorem je použit pro rychlý monitoring a hodnocení antioxidačních účinků (či schopnosti vyplavovat radikály) biologických vzorků. Tato automatizovaná metoda je založena na známé reakci stabilizovaného radikálu 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) s antioxidanty v organickém nebo vodně-organickém médiu, což vede k zesvětlení (změně barvy, odbarvení) DPPH v důsledku jeho interakce s analytem. Pokles absorbance DPPH (měřeno při  $\lambda$  525 nm, což je absorpční maximum pro DPPH) souvisí s koncentrací antioxidantu v testovaném vzorku. S optimalizovanou SIA procedurou lze detekovat až mikromolární koncentrace modelových antioxidantů jako kyselina askorbová, kávová, (+) katechin, (–) epikatechin a rutin; a lze hodnotit koncentrace těchto antioxidantů v rozsahu mikromolů až milimolů. Takto lze zpracovat až 45 vzorků za hodinu. Díky své rychlosti a citlivosti je navrhovaná SIA metoda vhodná pro vykonávání rutinních testů (screeningů) přítomnosti různých

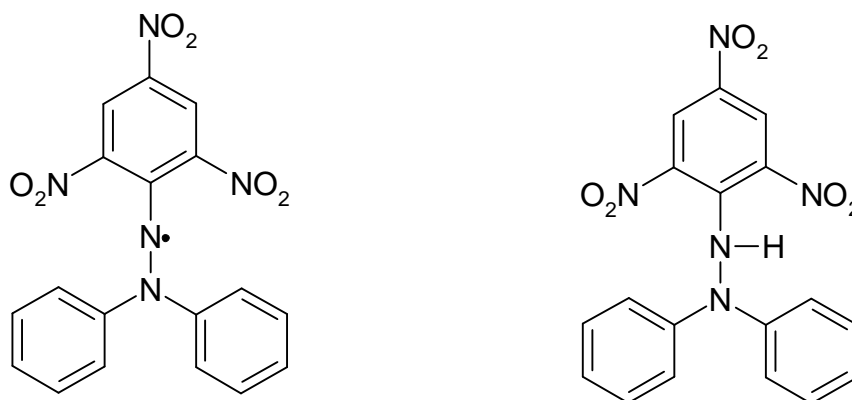
antioxidantů ve velkých sériích lyofilizovaných bylinných nebo houbových extraktů (množství vzorku nutné pro analýzu je několik miligramů).



Obr. 18 – schéma zapojení systému SIA.

Analyt obsažený v roztoku vzorku je převeden na detekovatelný produkt. Produkt je získán smísením vzorku a činidla a jejich následnou chemickou reakcí v toku nosného proudu. S využitím šesticestného ventilu a pístového čerpadla je nejprve aspirována zóna nosného proudu, poté zóna vzorku, zóna činidla a nakonec opět zóna nosného proudu. Po aspiraci všech zón je pohyb čerpadla obrácen a dochází k promísení vzorku s činidlem. Reakční produkt je unášen do průtokového detektoru s diodovým polem a je měřena absorbance tohoto produktu. Odezva detektoru má podobu tzv. píků (lokálních maxim grafu detektoru). Součástí SIA systému je mikroprocesor (PC), s programovým vybavením, který řídí jednotlivé kroky cyklu, sbírá a vyhodnocuje výstupní data. Optimální teplota provádění SIA experimentů je  $22 \pm 1$  °C. Doporučuje se provádět měření třikrát (u některých vzorků je vhodné provést i 10 měření). Optimální hodnota pH pro měření SIA je 5. (Polášek, 2004).

Na Obr. 19 je znázorněn DPPH jako volný radikál a neradikál. Z volného, velmi stabilního radikálu DPPH se díky jeho inaktivaci antioxidantem, který je donorem vodíku, stane neradikál (Polášek a kol., 2004).



Obr. 19: DPPH jako volný radikál (vlevo) a jako neradikál (vpravo).

## 4. Experimentální část a výsledky

### 4.1. Potřeby

#### 4.1.1. Rozpouštědla, chemikálie a standardy

##### Rozpouštědla

Aceton č.  
n-Butanol č.  
Diethylether p. a.  
Ethanol č. (EtOH)  
Ethylformiát č. (HCOOEt)  
Formaldehyd 36-38% p. a.  
Isopropylalkohol 95% p. a.  
Methanol č. (MeOH)  
1-Propanol č. (PrOH)  
Toluen p. a.  
Voda superčistá (voda)

##### Chemikálie

Acetanhydrid č.  
Anilin č.  
Anisaldehyd p. a.  
2,6-dibromchinonchlorimid č.  
Difenylamin č.  
Dusičnan bismutitý zásaditý p. a.  
Dusičnan měďnatý trihydrát p. a.  
Dusitan sodný p. a.  
Fast Blue B salt p. a.  
D-Glukósa č.  
Hexakynoželezitan draselný č.  
Hydroxid amonný 26% č.  
Hydroxid sodný č.  
Hydroxylaminhydrochlorid p. a.  
Chlorid železitý č.  
Isatin č.

Jodid draselný č.  
2,4,6-Kolidin p. a.  
Křemelina č.  
Kyselina chloristá 70% p. a.  
Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (HCl)  
Kyselina octová 98% p. a. (CH<sub>3</sub>COOH)  
Kyselina fosforečná 85% p. a.  
Kyselina mravenčí 85% p. a. (HCOOH)  
Kyselina sírová 96% p. a.  
Kyselina sulfanilová p. a.  
Kyselina vinná č.  
1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina p. a.  
Ninhydrin p. a.  
Octan zinečnatý č.  
Uhličitan sodný č.  
Vanilin p. a.

##### Standardy

Fenylalanin  
D-glukosa č.  
Cholesterol  
Kyselina L-askorbová č.  
Kyselina gallová č.  
Kyselina vinná č.  
Resorcinol č.  
β-Sitosterol č.  
Skulerin

#### 4.1.2. Detekční činidla

- **D1: UV  $\lambda = 254$  nm**

Chromatogram byl pozorován pod UV lampou při  $\lambda = 254$  nm. Pozitivní reakce se projevila vznikem různě tmavých skvrn, ve kterých byl zhasen fluoreskující luminofor vrstvy chromatogramu.

- **D2: UV  $\lambda = 366$  nm**

Chromatogram byl pozorován pod UV lampou při  $\lambda = 366$  nm. Pozitivní reakce se projevila vznikem fluoreskujících skvrn.

- **D3: Acetanhydrid – kyselina sírová (Liebermann-Burchardovo činidlo)**

Před použitím bylo opatrně za chlazení smícháno 5 ml acetanhydridu s 5 ml koncentrované kyseliny sírové a získaná směs opatrně přidána do 50 ml ochlazeného absolutního ethanolu. Chromatogram byl po postřiku zahříván při teplotě 100 °C asi 7 minut a vyhodnocen pod UV světlem při  $\lambda = 365$  nm. Při pozitivní reakci vznikají fluoreskující skvrny (Stahl, 1969).

- **D4: Anisaldehyd – kyselina sírová**

Do roztoku 0,5 ml anisaldehydu v 50 ml kyseliny octové byl přidán 1 ml kyseliny sírové. Chromatogram byl zahříván na 100 – 105 °C než různě barevné skvrny dosáhly maximální intenzity (Stahl, 1969).

- **D5: 2,6-Dibromchinonchlorimid (Gibbsovo činidlo)**

Po postřiku čerstvě připraveným 0,4% methanolovým roztokem 2,6-dibromchinonchlorimidu byl chromatogram umístěn do komory obsahující 26% hydroxid amonný. Fenolické sloučeniny tvořily s činidlem žluté až hnědé skvrny podle doby působení hydroxidu amonného (Stahl, 1969).

- **D6: Difenylamin – anilin – kyselina fosforečná**

Jeden gram anilinu a 1g difenylaminu byly rozpuštěny v 100 ml acetonu. 10 ml tohoto roztoku bylo před použitím smícháno s 1 ml 85% kyseliny fosforečné. Po postřiku byl chromatogram zahříván při 120 °C asi 5 minut. Vznikaly různě barevné skvrny (Šanšúnová, 1977).

- **D7: Dragendorffovo činidlo podle Muniera**

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 1:1 (v/v), který může být uchováván po několik měsíců v lednici.

Detekční roztok byl připraven rozpuštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Alkaloidy byly po reakci s detekčním činidlem zbarveny oranžově (Stahl, 1969).

- **D8: Fast Blue B salt**

Detekční roztok I: čerstvě připravený 0,5% roztok Fast Blue B salt.

Detekční roztok II: 0,1 M NaOH.

Chromatogram byl nejprve postříkán roztokem I, po uschnutí chromatogramu roztokem II. Vznikaly různě zbarvené skvrny (Stahl, 1969).

- **D9: Glukóza – anilin (Schweppovo činidlo)**

Roztok A: 10% vodný roztok glukózy.

Roztok B: 10% etanolový roztok anilinu.

Činidlo připraveno smícháním roztoku A a B (po 20 ml) a zředěno na 100 ml n-butanolem. Chromatogram byl zahříván 10 minut na 115 °C. Vznikaly červené až hnědé skvrny (Stahl, 1969).



- **D10: Hexakynoželezitan draselný – chlorid železitý**

Dvoupromětný roztok chloridu železitého byl smíchán s 1% roztokem hexakynoželezitanu draselného (1:1). Vznikají modré skvrny. Činidlo je stále nejdéle 5 minut. Vznikaly modré, resp. zelené skvrny (Stahl, 1969).

- **D11: Hydroxylamin – chlorid železitý**

Roztok A: byl připraven rozpuštěním 20 g chloridu hydroxylaminia v 50 ml vody a doplněním do 200 ml ethanolem.

Roztok B: byl připraven rozpuštěním 50 g hydroxidu draselného v minimálním množství vody a zředěn na 500 ml ethanolem.

Detekční roztok I: byl získán smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 1:2 a odfiltrováním vyloučeného chloridu draselného.

Detekční roztok II: byl získán rozpuštěním 10 g chloridu železitého ve 20 ml 35 % kyseliny chlorovodíkové a protřepáním s 200 ml diethyletheru do vzniku homogenního roztoku. K detekci byl použit nejprve detekční roztok I, po uschnutí chromatogramu pak roztok II. Vznikaly různě zbarvené skvrny (hnědofialové-fialové) (Stahl, 1969).

- **D12: Isatin – octan zinečnatý**

Isatin (1 g) a octan zinečnatý (1,5 g) byly rozpuštěny ve 100 ml 95% isopropylalkoholu za tepla do 80 °C. 1 ml octové kyseliny bylo přidáno po ochlazení. Chromatogram byl ponechán asi 20 hodin při pokojové teplotě a byl pozorován. Při pozitivní reakci byly pozorovány až červené skvrny (Stahl, 1969).

- **D13: 1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina – kyselina chloristá**

0,1 g 1,2-naftochinon-4-sulfonové kyseliny bylo rozpuštěno ve 100 ml směsi (20 ml ethanolu + 10 ml 60% kyseliny chloristé + 1 ml formaldehydu + 9 ml destilované vody). Po postřiku činidlem byl chromatogram zahřátý na 70 - 80 °C a byly pozorovány různě barevné skvrny (Stahl, 1969).

- **D14: Ninhydrin – kolidin**

Roztok A: byl připraven smícháním 0,2% roztoku ninhydrinu v 50 ml absolutního ethanolu, 10 ml ledové kyseliny octové a 2 ml 2,4,6-kolidinu.

Roztok B: 1% roztok trihydrátu dusičnanu měďnatého v absolutním ethanolu. Před použitím byl smíchán roztok A s roztokem B v poměru 5:3. Po postřiku byl chromatogram zahříván při 100 °C 1 až 2 minuty. Při pozitivní reakci byly pozorovány různě zbarvené skvrny (Šanšúnová, 1977).

- **D15: Paulyho činidlo (diazotovaná kyselina sulfanilová)**

4,5 g kyseliny sulfanilové bylo za tepla rozpuštěno ve 45 ml kyseliny chlorovodíkové (12 M) a zředěno vodou na 500 ml. 10 ml bylo ochlazen v chladničce a pak k němu bylo přidáno 10 ml ochlazeného 4,5% roztoku dusitanu sodného. Získaný roztok byl ponechán 15 minut v chladničce. Bezprostředně před použitím byl smíchán s 20 ml 10% roztoku uhličitanu sodného. Pozitivně reagující látky tvořily s činidlem oranžové skvrny (Stahl, 1969).

- **D16: Vanilin – kyselina sírová**

Vanilin (3 g) byl rozpuštěn v ethanolu (100 ml) a do roztoku přidána koncentrovaná kyselina sírová (3 ml). Chromatogram byl zahříván na 110 °C. Vznikly různě barevné skvrny (Stahl, 1969).

#### **4.1.3. Přístrojové vybavení**

- Počítačově řízený (pomocí programu FIALab for Windows 5.0) FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) s pístovým čerpadlem o objemu 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, USB2000-UV/VIS spektrofotometrem s halogenovou lampou LS-1 (Ocean Optics, USA) a průtokovou detekční celou SMA-Z s optickou délkou 1 cm; objem mísící cívky je 0,6 ml a spojovací teflonové hadičky (PTFE) mají průměr 0,72 mm.
- Ultrazvuková lázeň SONOREX Super 10P (Bandelin, Německo).

- Vakuová odparka Rotavapor R-114 a vodní lázeň Waterbath B-480 (Büchi, Švýcarsko).

#### **4.1.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii**

S 1: toluen + ethylformiát + kyselina mravenčí = 50 + 40 + 10

(toluen + HCOOEt + HCOOH)

S 2: n-propanol + voda = 90 + 10

(PrOH + voda)

#### **4.1.5. Chromatografický adsorbent**

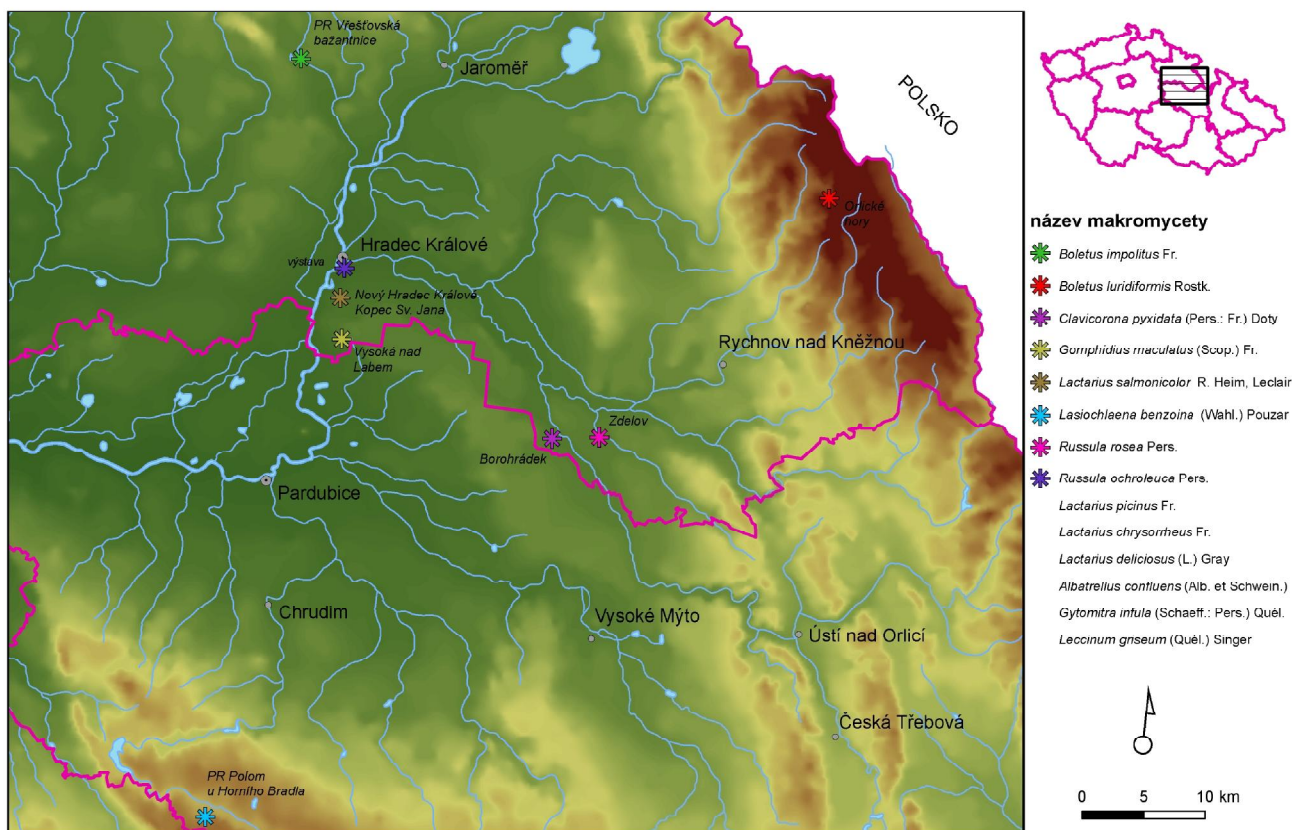
TLC Silica gell 60 F254 (Merck, Německo)

## 4.2. Příprava extraktů

### 4.2.1. Materiál

Plodnice zkoumaných hub byly nasbírány v letech 2004, 2006, 2007 a 2008 a systematicky klasifikovány Východočeskou mykologickou společností. Poté byly zmrazeny tekutým dusíkem a do doby jejich zpracování uskladněny v plastických sáčkách při teplotě  $-23^{\circ}\text{C}$  až  $-27^{\circ}\text{C}$ .

### LOKALITY SBĚRU VZORKŮ MAKROMYCET



Obr. 20: Lokality sběru vzorků makromycet.

### 4.2.2. Extrakce a příprava lyofilizátu z plodnice houby

Navážený očištěný vzorek plodnice houby (max. 15 g) byl po rozmixování tyčovým mixérem extrahován 70% ethanolem (poměr houby v gramech k 70% EtOH (ml), kterého musí být min. 80 ml, je 1: 15). Extrakce probíhala sonikací v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut, teplotě  $22^{\circ}\text{C}$  a intenzitě 10. Filtrací byl oddělen pevný podíl od extraktu, pevný podíl byl poté ještě promyt 3x10 ml

rozpouštědla a opět zfiltrován. Filtrát byl dále odpařen na vakuové rotační odparce za sníženého tlaku při teplotě 50 °C až do odstranění veškerého etanolu. K zahuštěnému extraktu bylo přidáno 10 ml superčisté vody. Roztok byl zfiltrován přes křemelinu na filtračním tubusu za sníženého tlaku do 100 ml baňky. Filtrační vrstva byla ještě promyta 3x5 ml superčisté vody. Z extraktu byla opět odpařována voda na rotační odparce pod sníženým tlakem, při teplotě 50 °C až do doby, kdy měl extrakt medovou konzistenci. Poté byl extrakt dobře uzavřen a uschován v lednici. Dále následovala lyofilizace. Lyofilizát byl umístěn přes noc do exsikátoru nad silikagel, díky němuž došlo k odstranění zbytkové vody. Lyofilizovaný extrakt byl přeplněn do vzduchotěsné penicilinky, převrstven argonem a uzavřen. Extrakt byl uchováván v mrazničce a stal se výchozím materiálem pro stanovení antioxidační aktivity a pro hodnocení tenkovrstvou chromatografií.

### 4.3. Hodnocení extraktů barevnými reakcemi na TLC

Vzorky pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly připraveny rozpuštěním 10 mg lyofilizátu v 1 ml rozpouštědla (70% EtOH). TLC byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografických komorách sycených jednu hodinu parami elučních soustav.

#### 4.3.1. Faktické údaje

**Adsorbent:** TLC Silica gell 60 F254 (Merck, Německo)

**Dráha:** 80 mm

**Soustava:** S 1: toluen + ethylformiát + kyselina mravenčí = 50 + 40 + 10

S 2: propanol + voda = 90 + 10

**Detekce:** D 1 – D 16

**Dráhy jednotlivých vzorků hub** 1 – 14

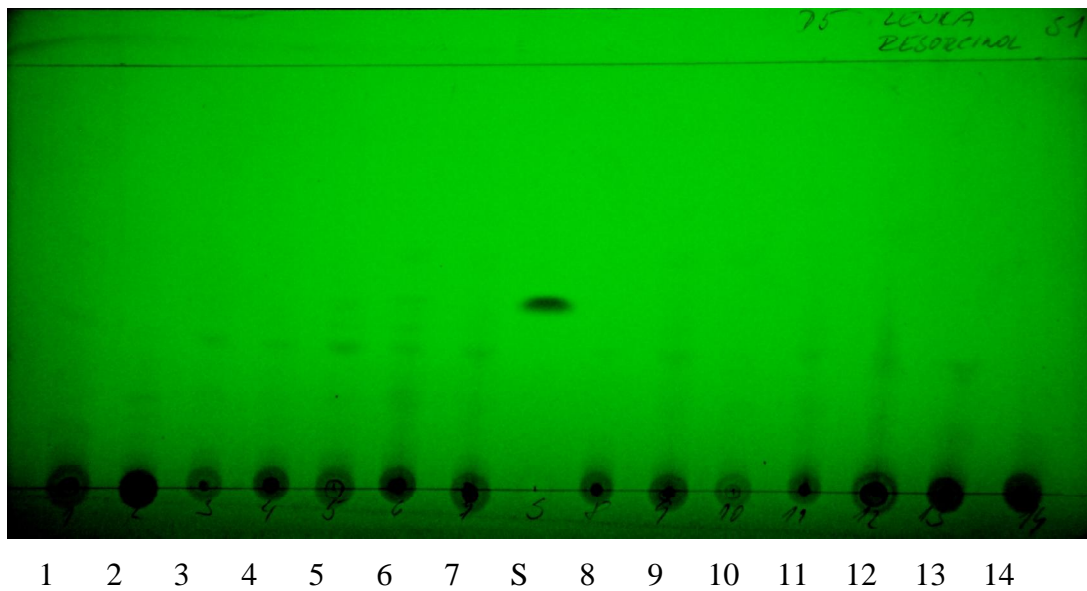
**Dráha S** – dráha standardu

Tab. 3: Přehled značení jednotlivých zkoumaných druhů.

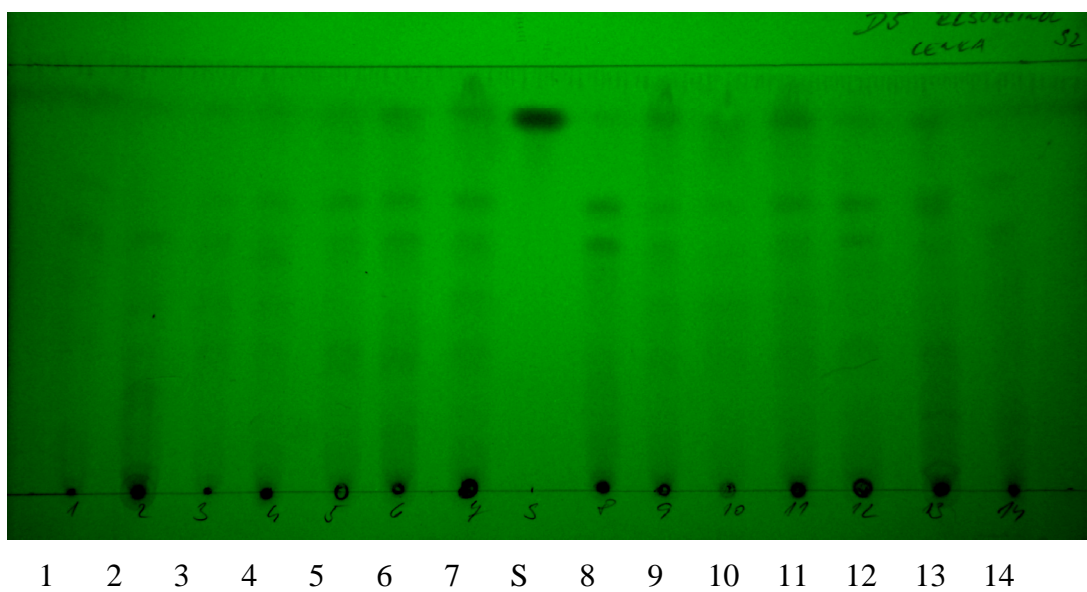
| Číslo vzorku u TLC | Označení vzorku | Druh  |
|--------------------|-----------------|---|
| 1                  | F005/07         | <i>Lactarius chrysorrheus</i> Fr.                   |
| 2                  | F023/04         | <i>Leccinum griseum</i> (Quél.) Singer              |
| 3                  | F011/06         | <i>Boletus impolitus</i> Fr.                        |
| 4                  | F004/08         | <i>Lactarius picinus</i> Fr.                        |
| 5                  | F006/06         | <i>Clavicornia pyxidata</i> (Pers.:Fr.) Doty        |
| 6                  | F013/06         | <i>Lasiochlaena benzoina</i> (Wahlenb.) Pouzar      |
| 7                  | F002/07         | <i>Lactarius deliciosus</i> (L.) Gray               |
| 8                  | F010/06         | <i>Russula ochroleuca</i> Pers.                     |
| 9                  | F002/08         | <i>Albatrellus confluens</i> (Alb. et Schw. ex Fr.) |
| 10                 | F009/06         | <i>Russula rosea</i> Pers.                          |
| 11                 | F006/07         | <i>Lactarius salmonicolor</i> R. Heim & Leclair     |
| 12                 | F003/07         | <i>Gomphidius maculatus</i> (Scop.) Fr.             |
| 13                 | F008/07         | <i>Gyromitra infula</i> (Schaeff.) Quél.            |
| 14                 | F002/06         | <i>Boletus luridiformis</i> Rostk.                  |

#### 4.3.2. Obrazová část

- Detekce pod UV  $\lambda = 254$



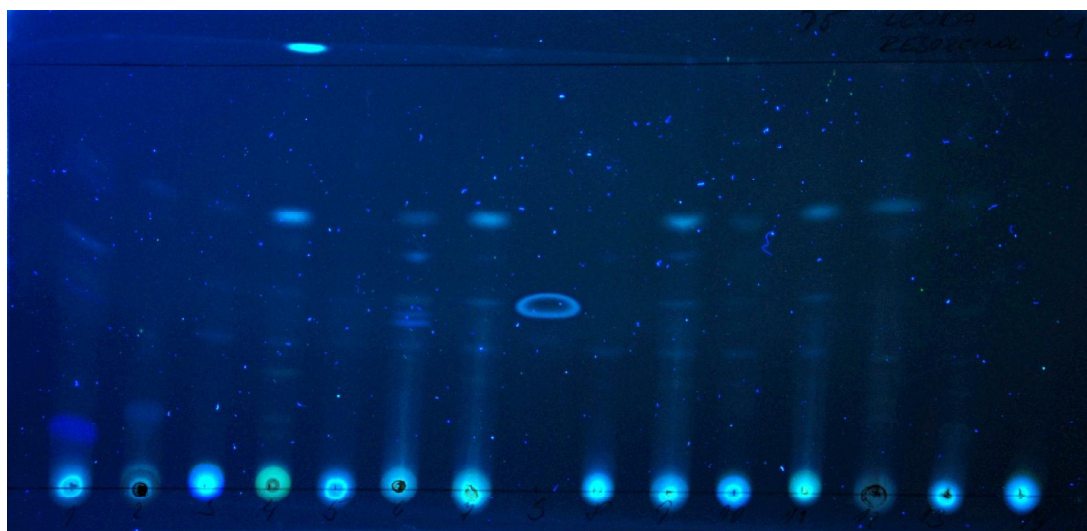
Obr. 21: S1, D1



Obr. 22: S2, D1

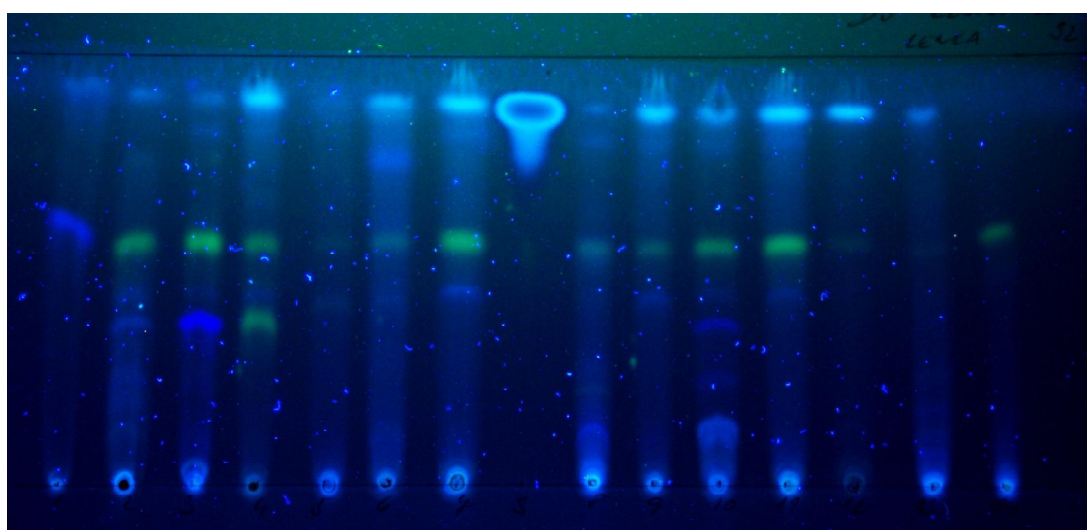


- Detekce pod UV  $\lambda = 366$



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 23: S1, D2

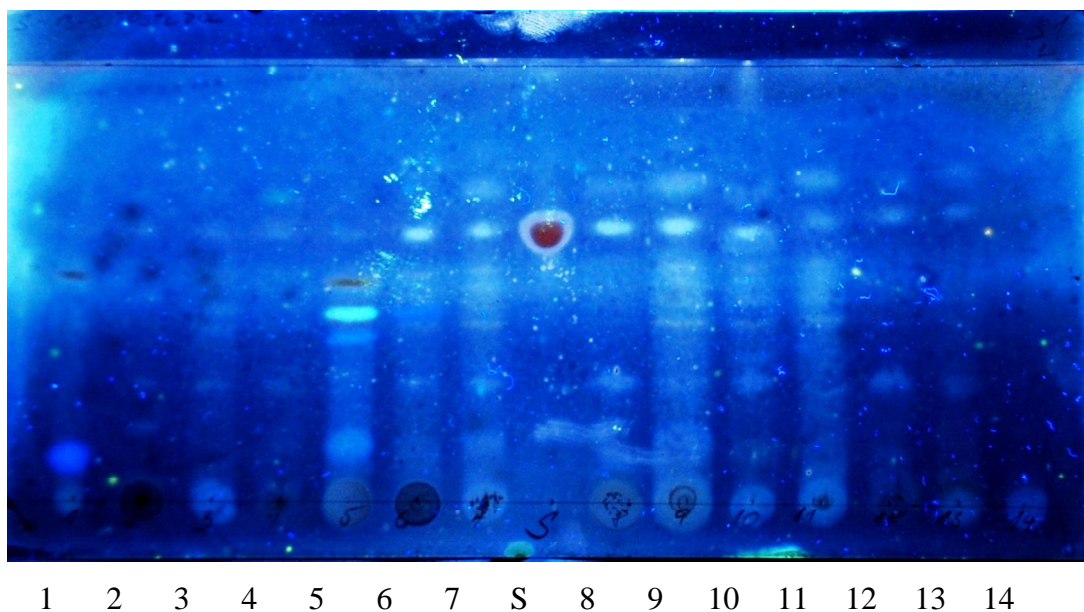


1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

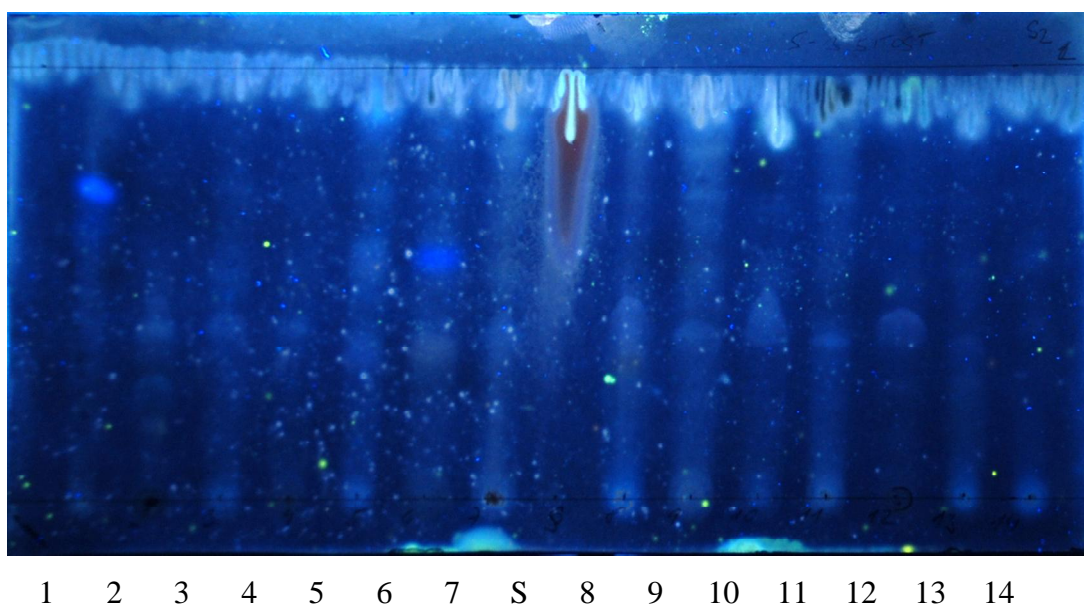
Obr. 24: S2, D2



- Detekce na steroly, steroidy, triterpeny



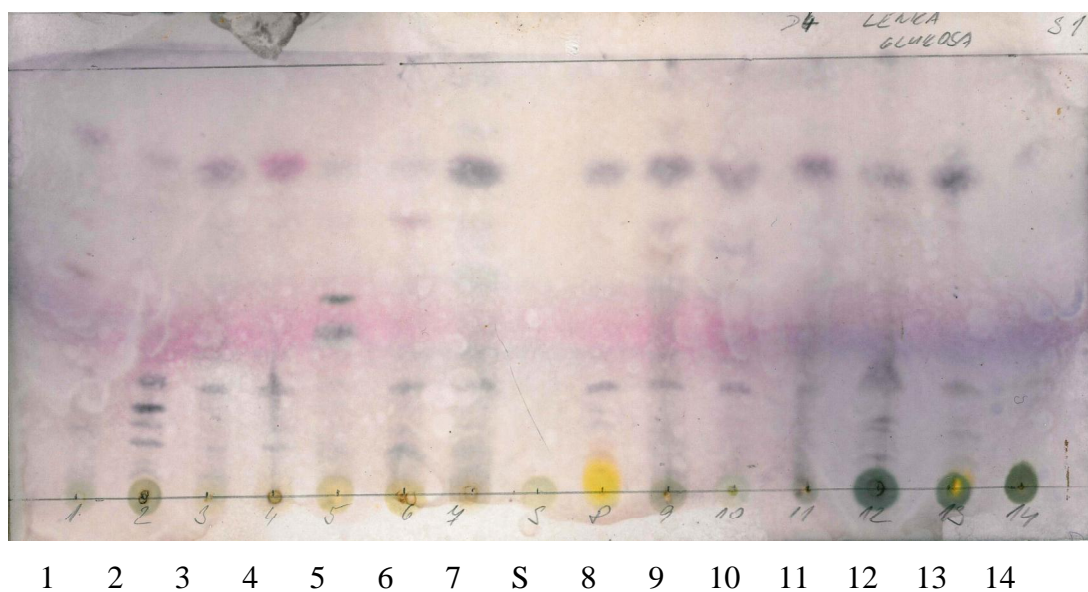
Obr. 25: S1, D3



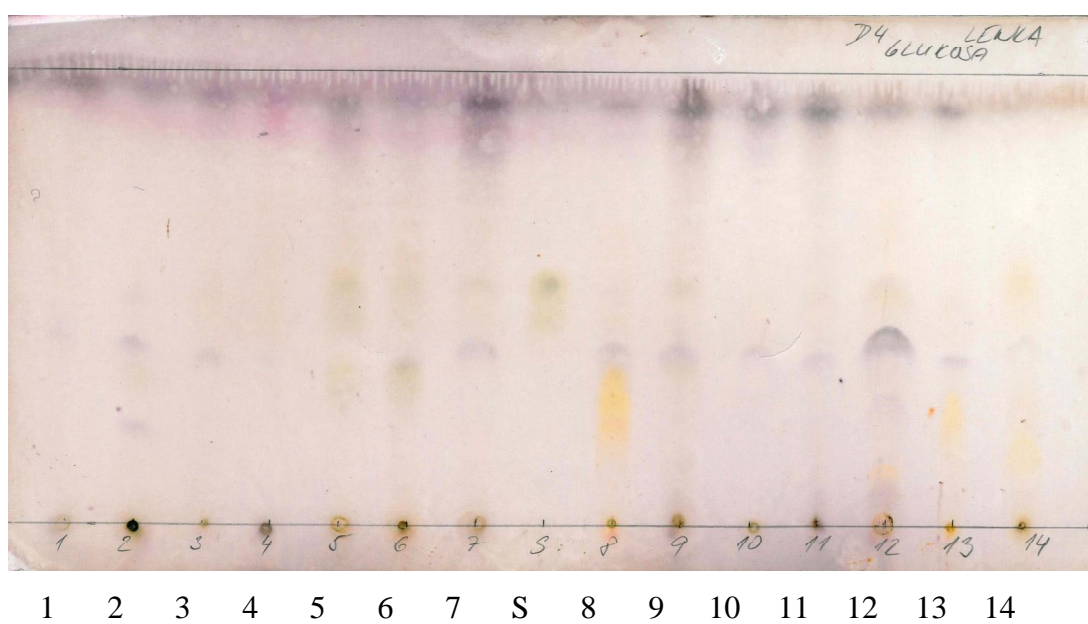
Obr. 26: S2, D3

Standard:  $\beta$ -Sitosterol

- Detekce na cukry, steroidy, terpeny



Obr. 27: S1, D4

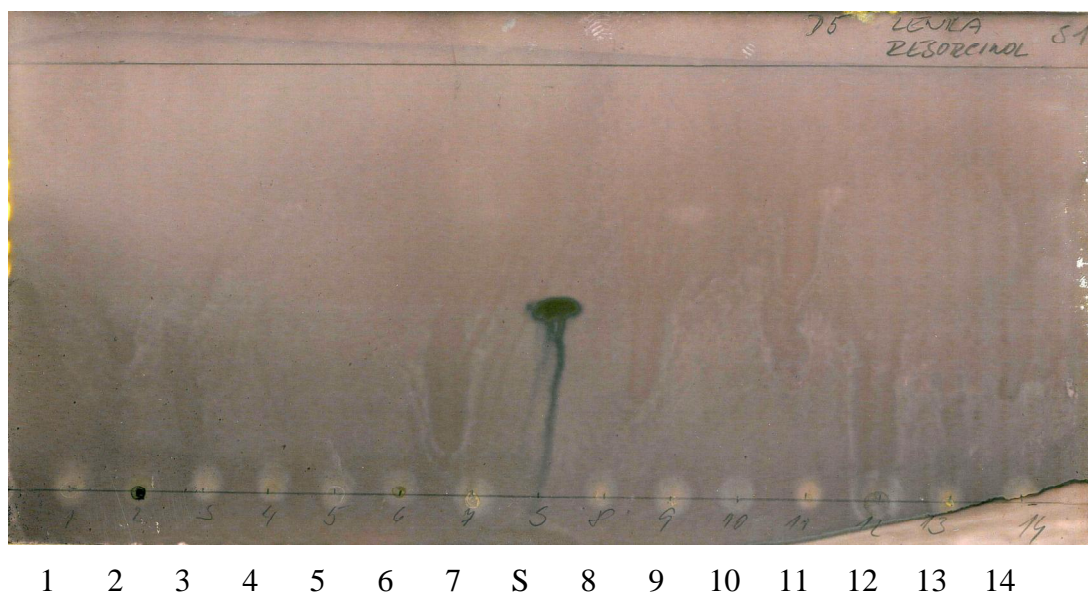


Obr. 28: S2, D4

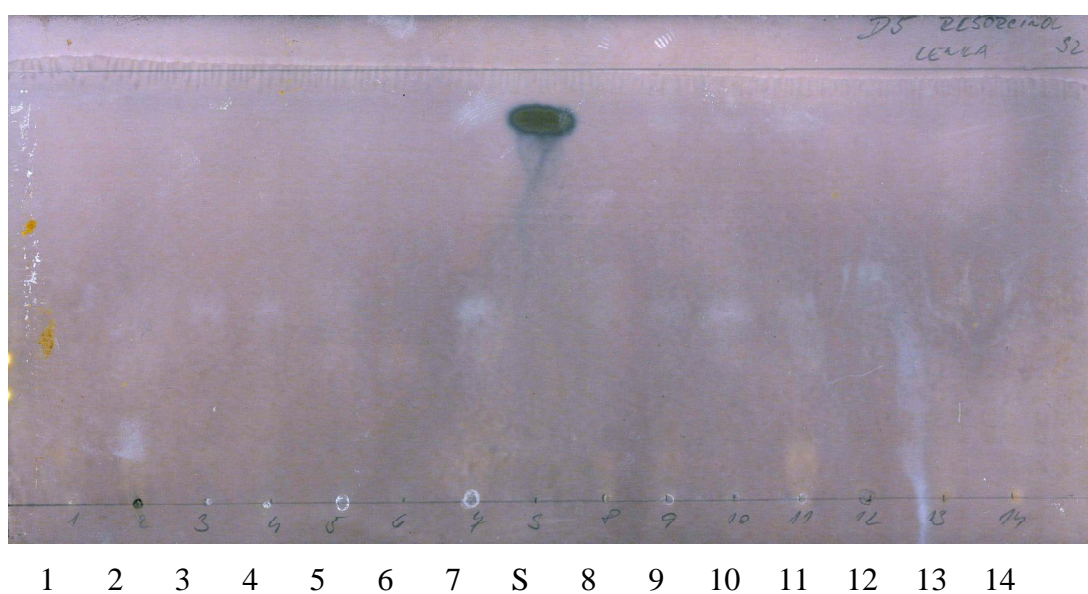
Standard: D-glukosa



- Detekce na fenolické sloučeniny



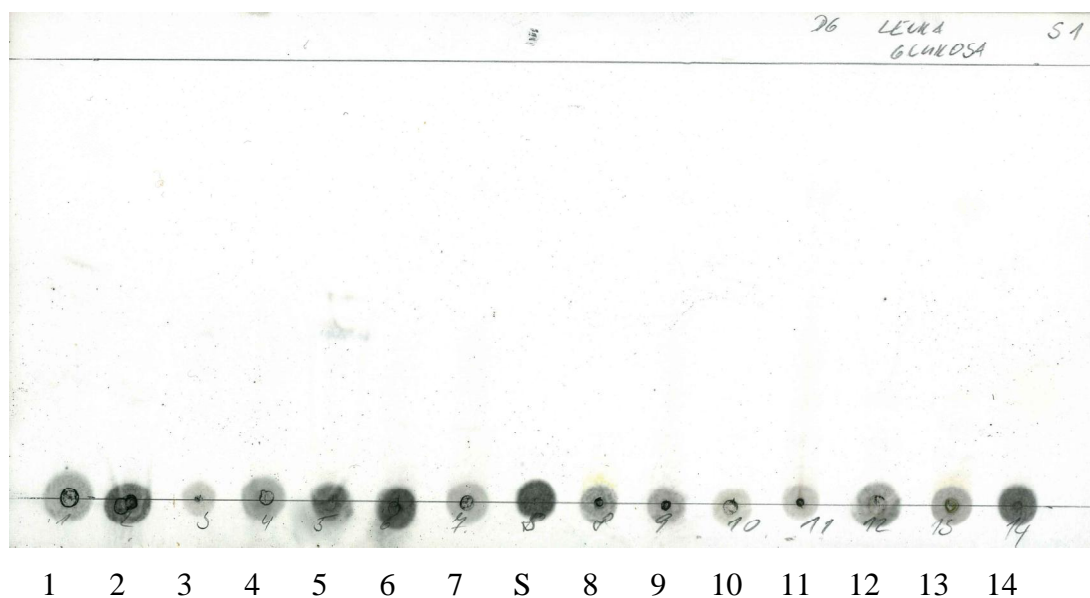
Obr. 29: S1, D5



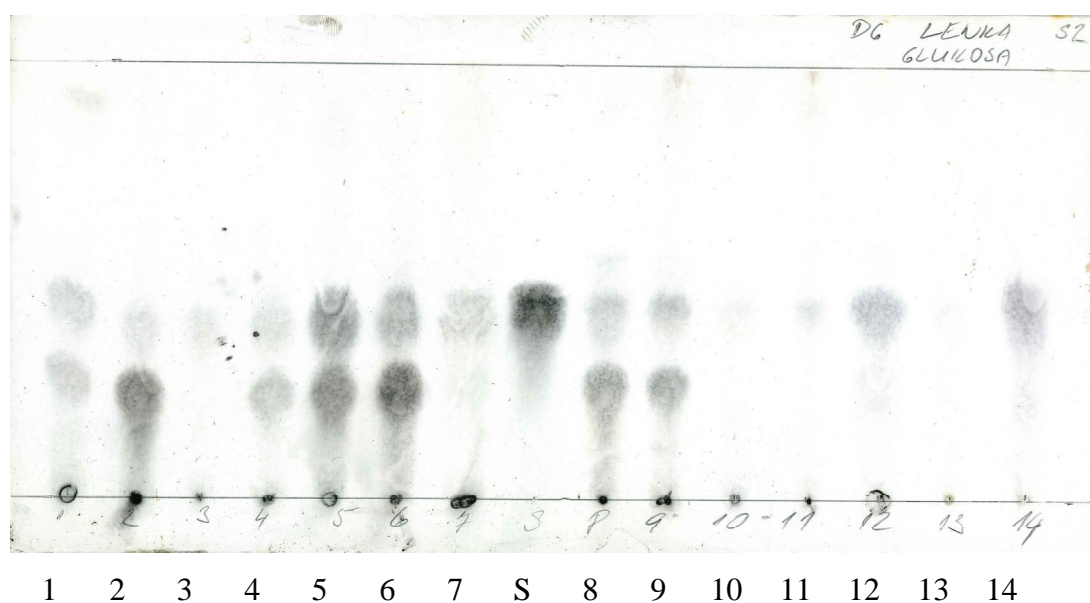
Obr. 30: S2, D5

**Standard: Resorcinol**

- Detekce na cukry



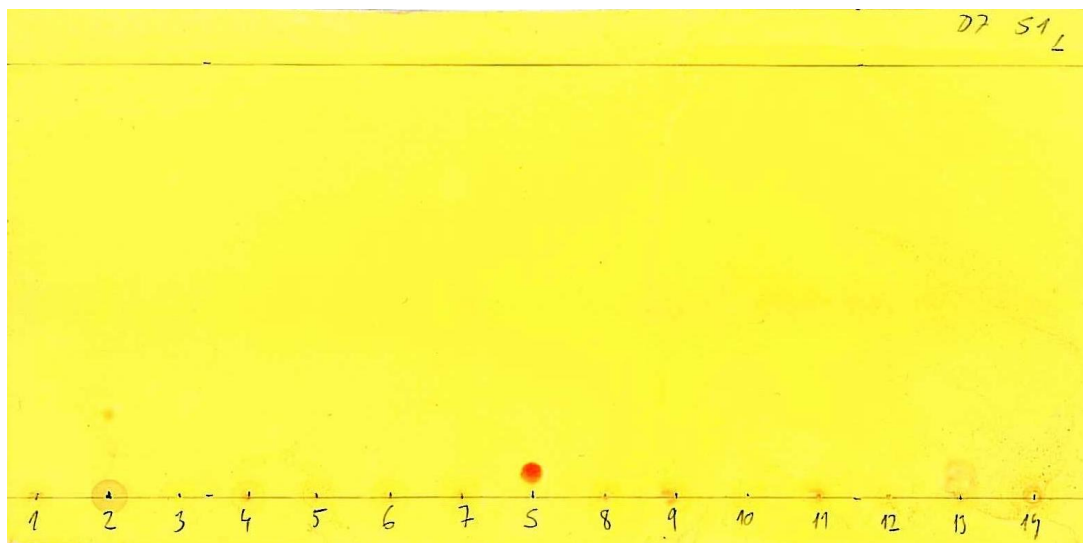
Obr. 31: S1, D6



Obr. 32: S2, D6

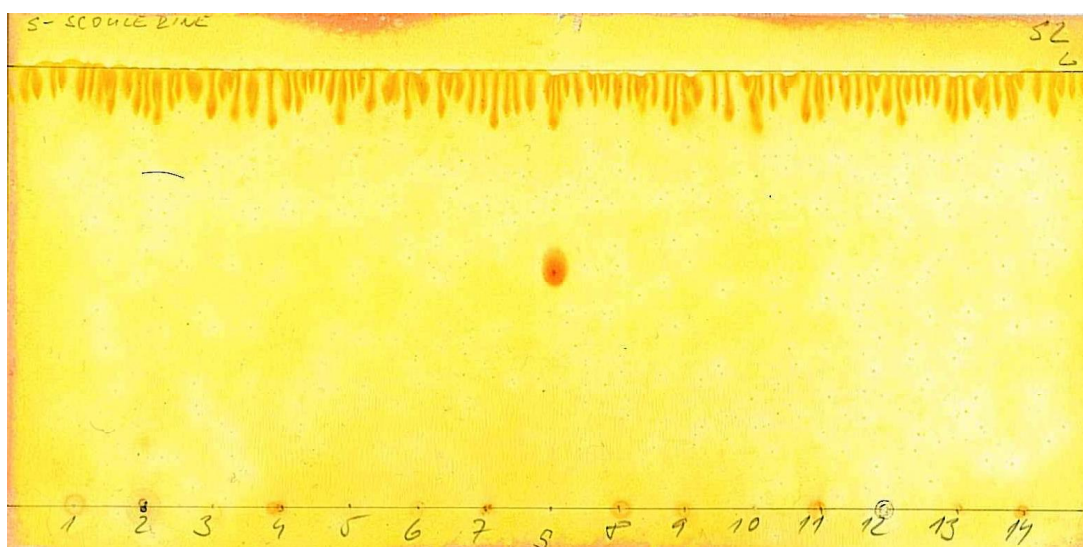
**Standard: D-glukosa**

- Detekce na alkaloidy



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 33: S1, D7



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 34: S2, D7

**Standard: Skulerin**

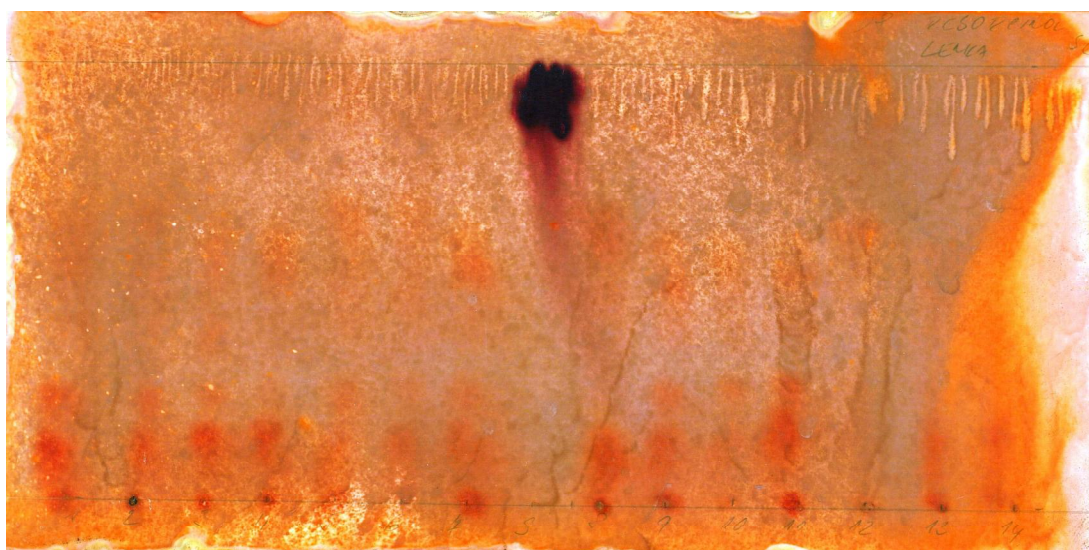


- Detekce na fenolické sloučeniny



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 35: S1, D8

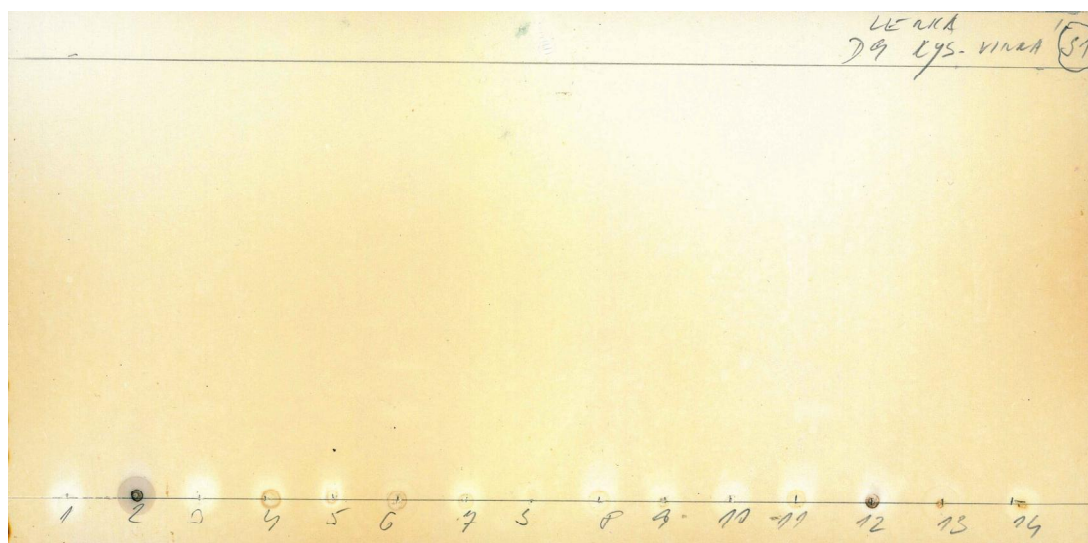


1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 36: S2, D8

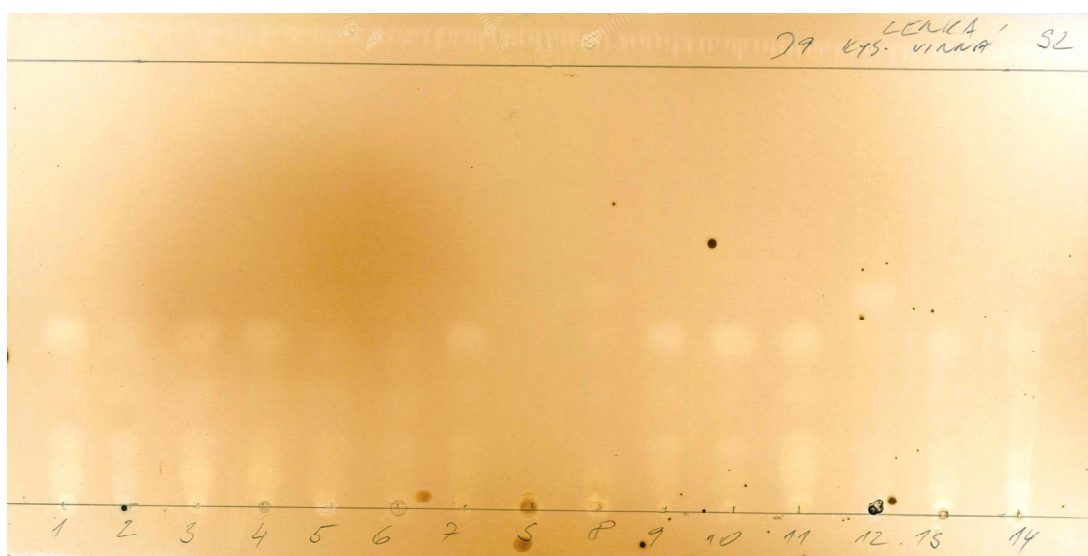
**Standard: Resorcinol**

- Detekce na karboxylové kyseliny



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 37: S1, D9



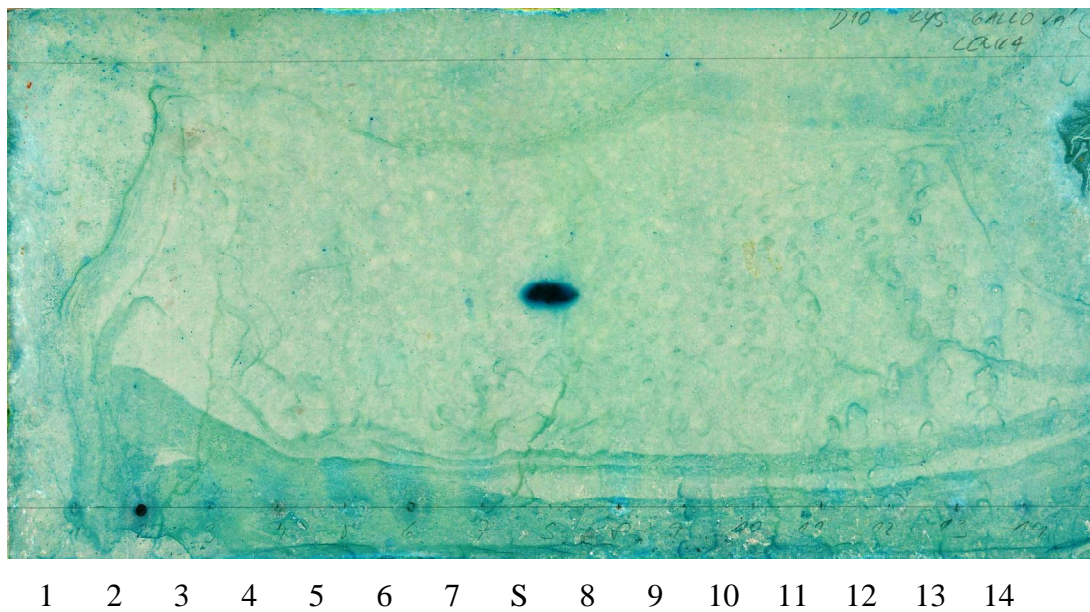
1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 38: S2, D9

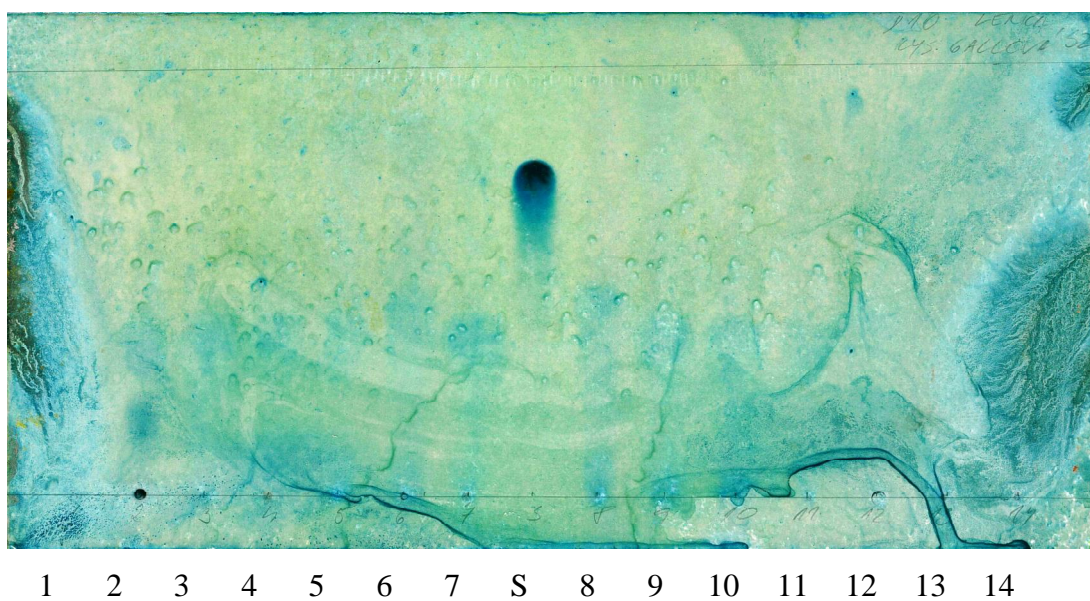
**Standard: Kyselina vinná**



- Detekce na redukující látky (fenoly, aminy, aj.)



Obr. 39: S1, D10

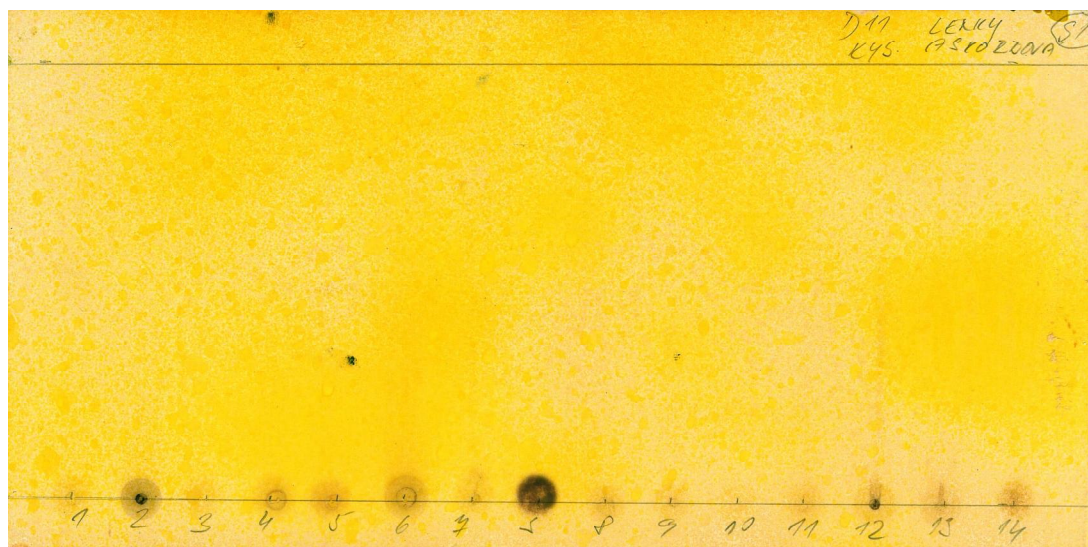


Obr. 40: S2, D10

**Standard: Kyselina gallová**



- Detekce na laktony



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 41: S1, D11

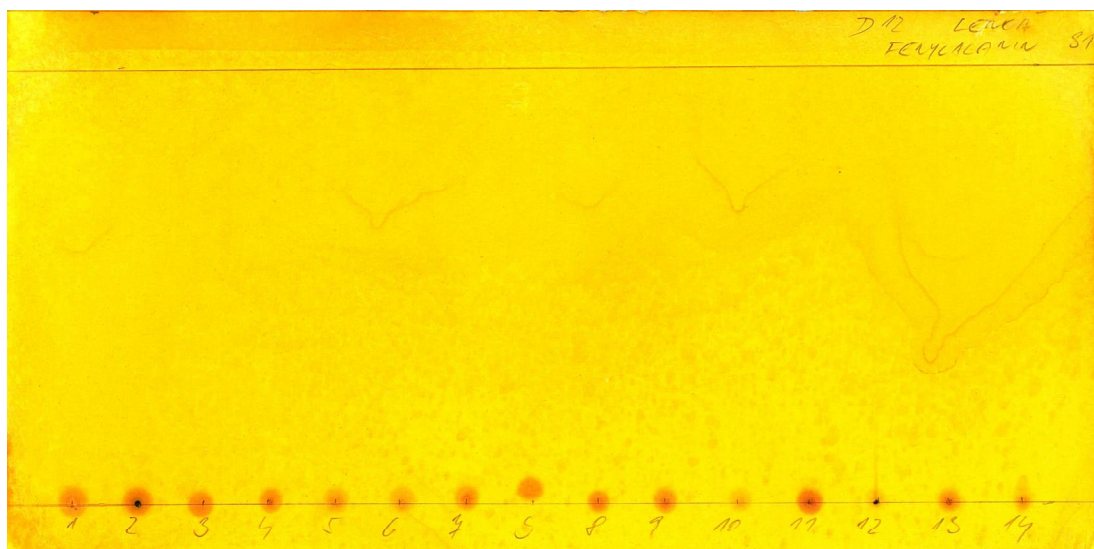


1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 42: S2, D11

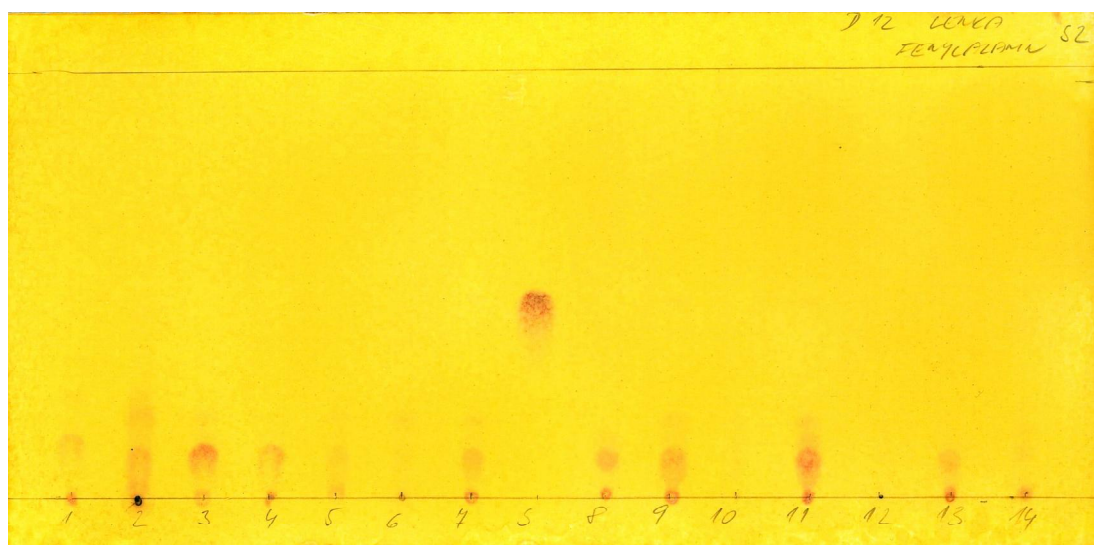
**Standard: Kyselina L-askorbová**

- Detekce na aminokyseliny



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 43: S1, D12



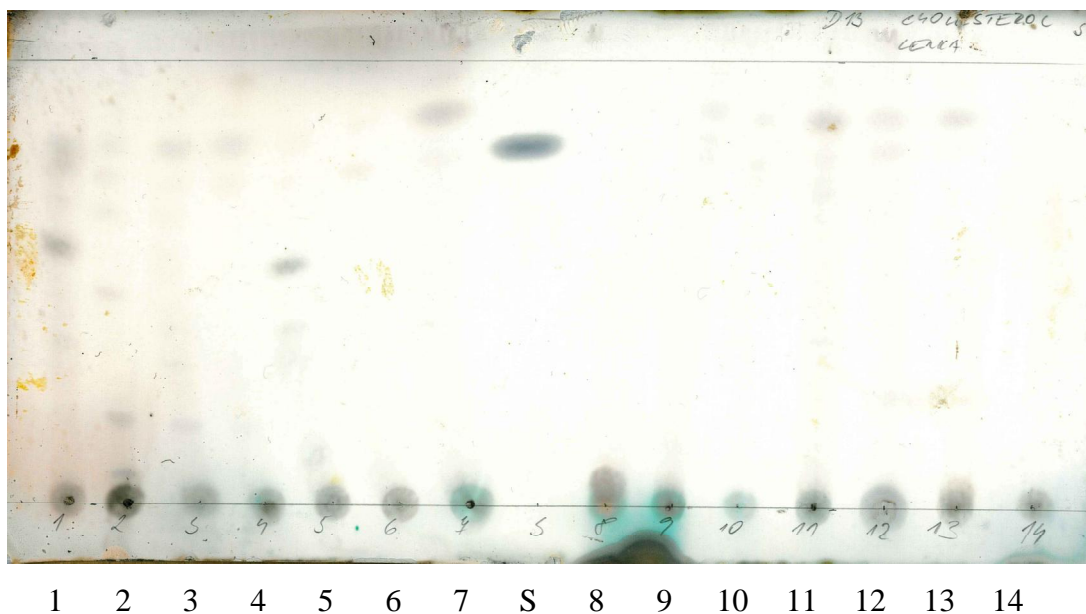
1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 44: S2, D12

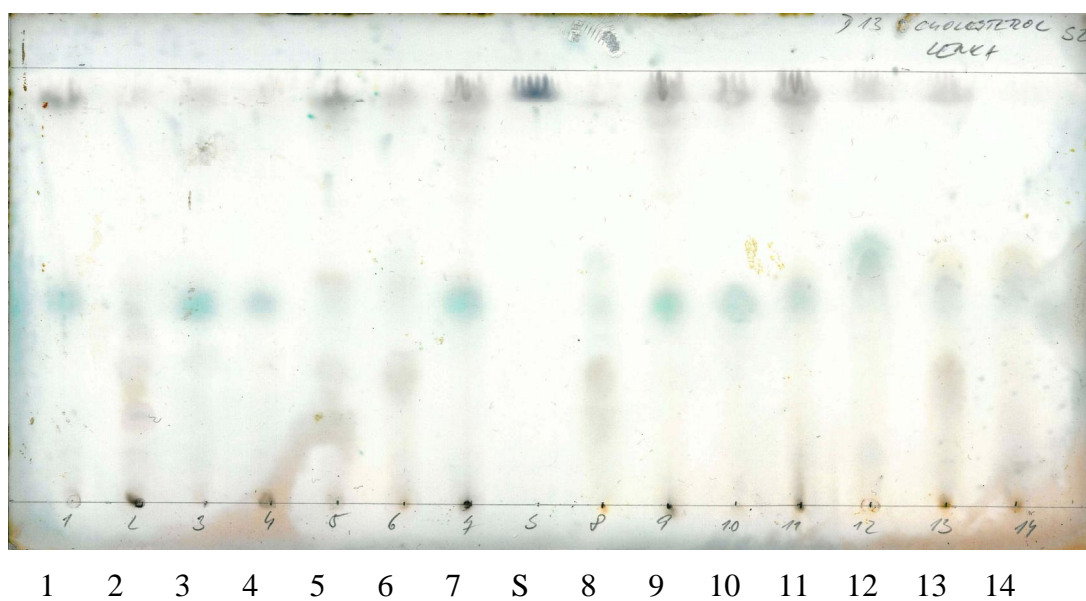
**Standard: Fenylalanin**



- **Detekce na steroly**



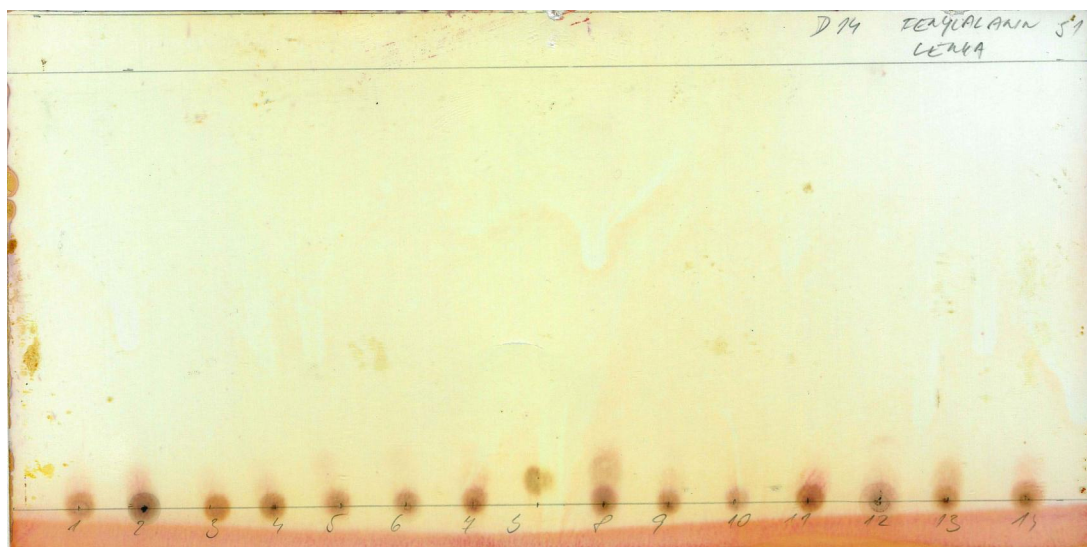
Obr. 45: S1, D13



Obr. 46: S2, D13

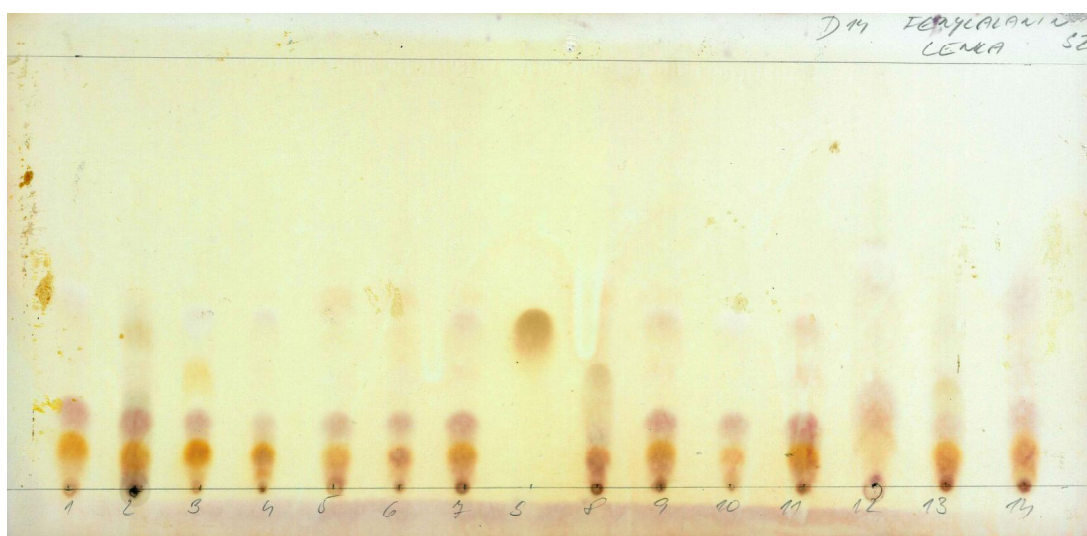
**Standard: Cholesterol**

- Detekce na aminokyseliny



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 47: S1, D14

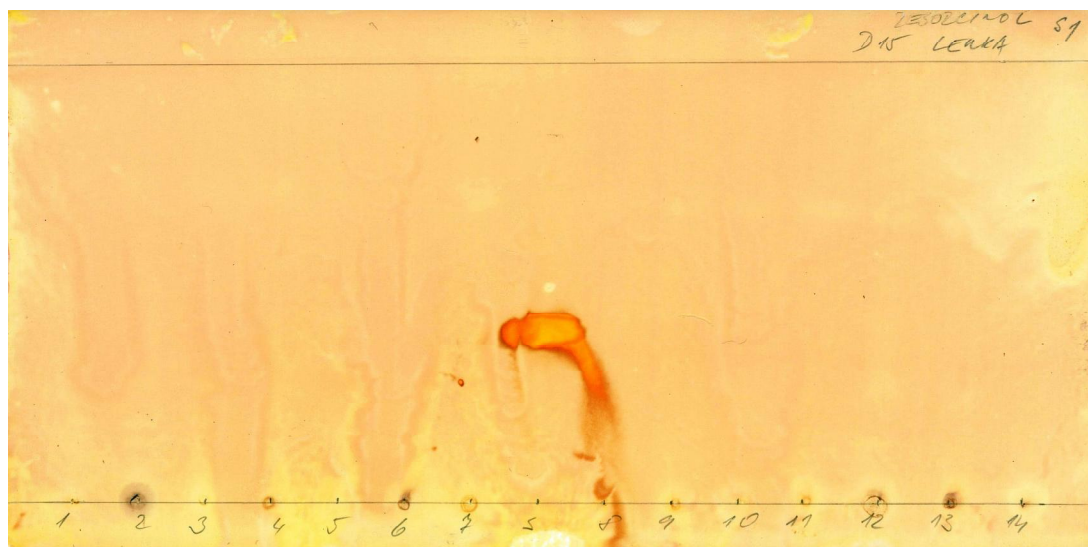


1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

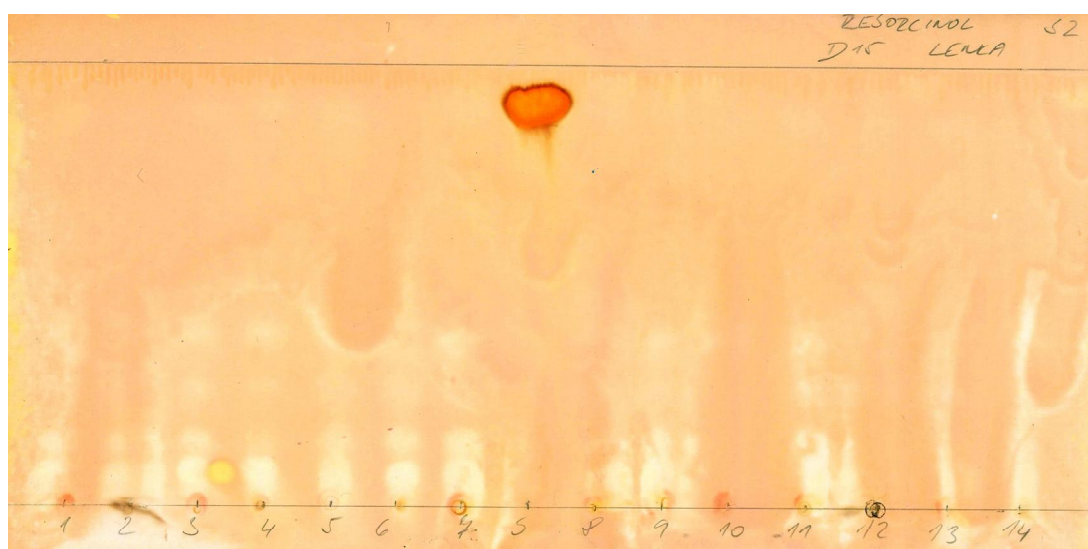
Obr. 48: S2, D14

**Standard: Fenylalanin**

- Detekce na fenoly a aminy



Obr. 49: S1, D15

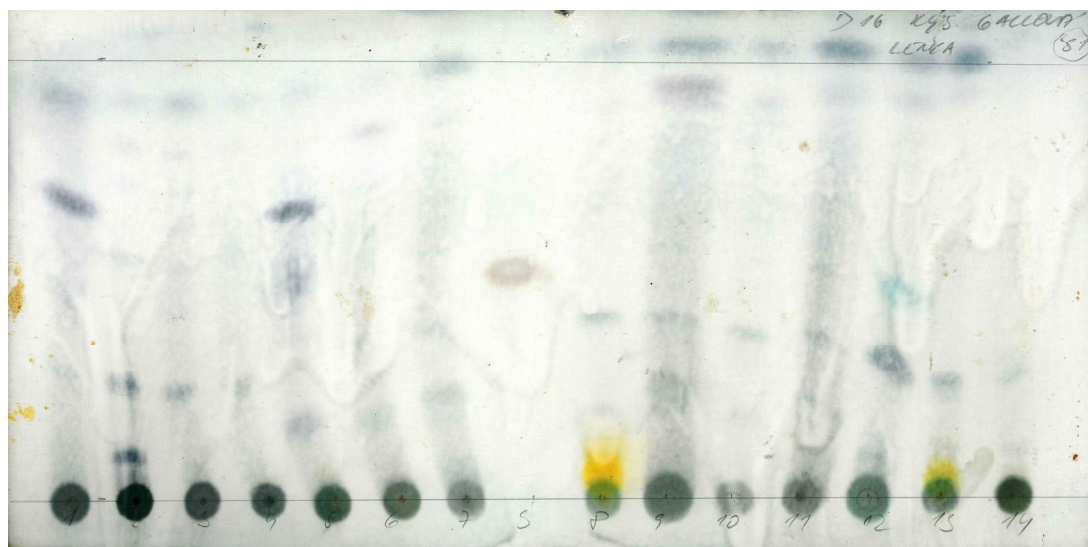


Obr. 50: S2, D15

**Standard: Resorcinol**

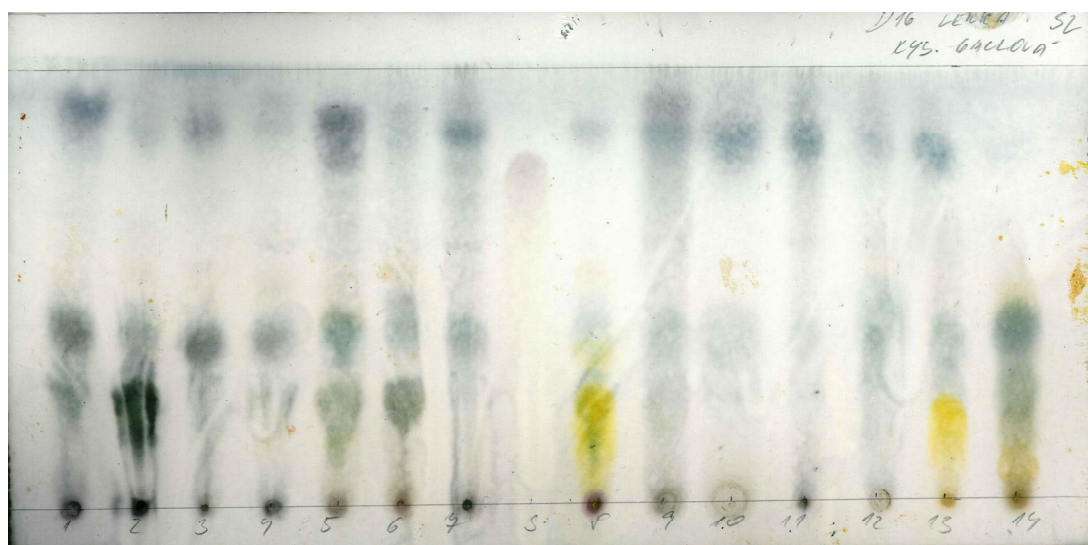


- Detekce na fenoly, steroidy, vyšší alkoholy



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 51: S1, D16



1 2 3 4 5 6 7 S 8 9 10 11 12 13 14

Obr. 52: S2, D16

**Standard: Kyselina gallová**

### 4.3.3. Vyhodnocení reakcí na detekce D 1 – D 16

#### Vysvětlivky k Tab. 4:

ST + pozitivní reakce při detekci na startu

ST 0 po detekci nebyla pozorována pozitivní reakce na startu

X+ počet pozitivních reakcí na detekci na dráze, kde  $X = 1, \dots, n$  ( $n \in N^+$ )

0 žádná pozitivní reakce na detekci na dráze

Tab. 4: Pozitivní reakce na detekce u sledovaných vzorků.

| vzorek                | D1S1                     | D1S2    | D2S1                 | D2S2    | D3S1                          | D3S2    |
|-----------------------|--------------------------|---------|----------------------|---------|-------------------------------|---------|
| 1.                    | ST+, 2+                  | ST+, 3+ | ST+, 5+              | ST+, 2+ | ST0, 0                        | ST0, 1+ |
| 2.                    | ST+, 1+                  | ST+, 3+ | ST+, 2+              | ST+, 5+ | ST+, 0                        | ST+, 1+ |
| 3.                    | ST+, 1+                  | ST+, 5+ | ST+, 3+              | ST+, 5+ | ST+, 0                        | ST0, 1+ |
| 4.                    | ST+, 1+                  | ST+, 5+ | ST+, 7+              | ST+, 4+ | ST+, 0                        | ST+, 1+ |
| 5.                    | ST+, 3+                  | ST+, 4+ | ST+, 2+              | ST+, 3+ | ST+, 3+                       | ST0, 2+ |
| 6.                    | ST+, 4+                  | ST+, 4+ | ST+, 6+              | ST+, 4+ | ST+, 1+                       | ST0, 2+ |
| 7.                    | ST+, 1+                  | ST+, 5+ | ST+, 5+              | ST+, 4+ | ST+, 3+                       | ST+, 2+ |
| 8.                    | ST+, 1+                  | ST+, 3+ | ST+, 2+              | ST+, 3+ | ST+, 1+                       | ST+, 2+ |
| 9.                    | ST+, 2+                  | ST+, 3+ | ST+, 6+              | ST+, 4+ | ST+, 3+                       | ST+, 2+ |
| 10.                   | ST+, 1+                  | ST+, 3+ | ST+, 5+              | ST+, 6+ | ST+, 2+                       | ST0, 1+ |
| 11.                   | ST+, 2+                  | ST+, 3+ | ST+, 3+              | ST+, 3+ | ST+, 2+                       | ST+, 1+ |
| 12.                   | ST+, 1+                  | ST+, 3+ | ST+, 3+              | ST+, 2+ | ST+, 2+                       | ST0, 2+ |
| 13.                   | ST+, 1+                  | ST+, 4+ | ST+, 5+              | ST+, 2+ | ST+, 1+                       | ST+, 1+ |
| 14.                   | ST+, 0                   | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 1+ | ST+, 1+                       | ST+, 1+ |
| detekovatelné skupiny | UV $\lambda$ 254         |         | UV $\lambda$ 366     |         | steroly, steroidy, triterpeny |         |
| vzorek                | D4S1                     | D4S2    | D5S1                 | D5S2    | D6S1                          | D6S2    |
| 1.                    | ST+, 4+                  | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST+, 0  | ST+, 0                        | ST+, 3+ |
| 2.                    | ST+, 7+                  | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0                        | ST+, 2+ |
| 3.                    | ST+, 3+                  | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST+, 1+ | ST+, 0                        | ST+, 1+ |
| 4.                    | ST+, 3+                  | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST+, 1+ | ST+, 0                        | ST+, 2+ |
| 5.                    | ST+, 3+                  | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 0  | ST+, 0                        | ST+, 2+ |
| 6.                    | ST+, 4+                  | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0                        | ST+, 2+ |
| 7.                    | ST+, 4+                  | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 2+ | ST+, 0                        | ST+, 1+ |
| 8.                    | ST+, 4+                  | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST+, 1+ | ST+, 0                        | ST+, 2+ |
| 9.                    | ST+, 5+                  | ST+, 3+ | ST+, 1+              | ST+, 2+ | ST+, 0                        | ST+, 2+ |
| 10.                   | ST+, 3+                  | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST+, 2+ | ST+, 0                        | ST+, 1+ |
| 11.                   | ST+, 2+                  | ST+, 2+ | ST+, 1+              | ST+, 2+ | ST+, 0                        | ST+, 1+ |
| 12.                   | ST+, 5+                  | ST+, 4+ | ST+, 0               | ST0, 1+ | ST+, 0                        | ST+, 1+ |
| 13.                   | ST+, 4+                  | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0                        | ST+, 0  |
| 14.                   | ST+, 1+                  | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0                        | ST+, 1+ |
| detekovatelné skupiny | cukry, steroidy, terpeny |         | fenolické sloučeniny |         | cukry                         |         |

Tab. 4 (pokračování): Pozitivní reakce na detekce u sledovaných vzorků.

| vzorek                | D7S1                             | D7S2    | D8S1                 | D8S2    | D9S1                 | D9S2    |
|-----------------------|----------------------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|
| 1.                    | ST+, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST+, 3+ |
| 2.                    | ST+, 1+                          | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 3+ |
| 3.                    | ST0, 0                           | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 4+ |
| 4.                    | ST+, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 4+ |
| 5.                    | ST0, 0                           | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST+, 4+ |
| 6.                    | ST0, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 3+ |
| 7.                    | ST+, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 2+ |
| 8.                    | ST+, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST+, 3+ |
| 9.                    | ST+, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 3+ |
| 10.                   | ST0, 0                           | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 3+ |
| 11.                   | ST+, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 3+ | ST+, 0               | ST+, 3+ |
| 12.                   | ST0, 0                           | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 13.                   | ST+, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 14.                   | ST+, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| detekovatelné skupiny | alkaloidy                        |         | fenolické sloučeniny |         | karboxylové kyseliny |         |
| vzorek                | D10S1                            | D10S2   | D11S1                | D11S2   | D12S1                | D12S2   |
| 1.                    | ST0, 0                           | ST0, 0  | ST0, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 2.                    | ST+, 0                           | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 2+ |
| 3.                    | ST+, 0                           | ST+, 1+ | ST0, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 4.                    | ST+, 0                           | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 5.                    | ST+, 0                           | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 6.                    | ST+, 0                           | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 0  |
| 7.                    | ST+, 0                           | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 8.                    | ST+, 0                           | ST+, 2+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 9.                    | ST0, 0                           | ST+, 1+ | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 10.                   | ST0, 0                           | ST+, 1+ | ST0, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST0, 0  |
| 11.                   | ST0, 0                           | ST+, 0  | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 12.                   | ST0, 0                           | ST0, 0  | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST0, 0  |
| 13.                   | ST+, 0                           | ST0, 0  | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST+, 1+ |
| 14.                   | ST0, 0                           | ST0, 0  | ST+, 0               | ST0, 0  | ST+, 0               | ST0, 0  |
| detekovatelné skupiny | redukující látky (fenoly, aminy) |         | laktony              |         | aminokyseliny        |         |



Tab. 4 (pokračování): Pozitivní reakce na detekce u sledovaných vzorků.

| vzorek                | D13S1   | D13S2   | D14S1         | D14S2   | D15S1          | D15S2   | D16S1                            | D16S2   |
|-----------------------|---------|---------|---------------|---------|----------------|---------|----------------------------------|---------|
| 1.                    | ST+, 3+ | ST+, 2+ | ST+, 0        | ST+, 2+ | ST0, 0         | ST+, 1+ | ST+, 2+                          | ST+, 3+ |
| 2.                    | ST+, 6+ | ST+, 6+ | ST+, 0        | ST+, 4+ | ST0, 0         | ST0, 1+ | ST+, 6+                          | ST+, 3+ |
| 3.                    | ST+, 2+ | ST+, 3+ | ST+, 0        | ST+, 3+ | ST0, 0         | ST+, 4+ | ST+, 7+                          | ST+, 2+ |
| 4.                    | ST+, 2+ | ST+, 2+ | ST+, 0        | ST+, 2+ | ST+, 0         | ST+, 3+ | ST+, 5+                          | ST+, 2+ |
| 5.                    | ST+, 2+ | ST+, 3+ | ST+, 0        | ST+, 3+ | ST0, 0         | ST+, 3+ | ST+, 6+                          | ST+, 3+ |
| 6.                    | ST+, 1+ | ST+, 3+ | ST+, 0        | ST+, 3+ | ST+, 0         | ST+, 3+ | ST+, 3+                          | ST+, 3+ |
| 7.                    | ST+, 2+ | ST+, 2+ | ST+, 0        | ST+, 3+ | ST+, 0         | ST+, 3+ | ST+, 5+                          | ST+, 2+ |
| 8.                    | ST+, 1+ | ST+, 5+ | ST+, 1+       | ST+, 2+ | ST0, 0         | ST+, 0  | ST+, 3+                          | ST+, 3+ |
| 9.                    | ST+, 0  | ST+, 2+ | ST+, 0        | ST+, 3+ | ST+, 0         | ST+, 0  | ST+, 4+                          | ST+, 3+ |
| 10.                   | ST+, 2+ | ST0, 2+ | ST+, 0        | ST+, 2+ | ST0, 0         | ST+, 0  | ST+, 4+                          | ST+, 2+ |
| 11.                   | ST+, 3+ | ST+, 2+ | ST+, 0        | ST+, 3+ | ST+, 0         | ST+, 0  | ST+, 4+                          | ST+, 2+ |
| 12.                   | ST+, 2+ | ST+, 2+ | ST+, 0        | ST+, 3+ | ST+, 0         | ST0, 0  | ST+, 4+                          | ST+, 2+ |
| 13.                   | ST+, 1+ | ST+, 3+ | ST+, 1+       | ST+, 3+ | ST+, 0         | ST+, 0  | ST+, 2+                          | ST+, 3+ |
| 14.                   | ST+, 0  | ST+, 1+ | ST+, 0        | ST+, 3+ | ST+, 0         | ST+, 0  | ST+, 2+                          | ST+, 4+ |
| detekovatelné skupiny | steroly |         | aminokyseliny |         | fenoly a aminy |         | fenoly, steroidy, vyšší alkoholy |         |

#### 4.4. Stanovení antioxidační aktivity metodou SIA se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu

##### 4.4.1. Postup práce

Před vlastním experimentem byl připraven roztok DPPH (0,1 mM) radikálu rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% EtOH ve 100 ml hnědé odměrné baňce, následně je roztok doplněn do 100 ml superčistou vodou a 5 min. odvzdušňován v ultrazvukové lázni. Dále byl připraven 50% EtOH, který byl rovněž 5 min. odvzdušňován. Takto připravený ethanol slouží pro přípravu vzorků, jako slepý vzorek a jako nosný proud v systému. Před vlastním testováním byly ještě připraveny roztoky extraktů a to odvážením cca 4 mg extraktu a přidáním takového množství 50% EtOH, aby vznikla koncentrace 1 mg/ml. Dalším ředěním byly připraveny koncentrace 0,5, 0,25 a 0,1 mg/ml. Všechny koncentrace připravených roztoků měřených vzorků byly rovněž odvzdušněny pomocí sonikace. Po nasátí roztoku DPPH přístrojem SIA mezi dvě zóny měřeného vzorku, resp. slepého vzorku, došlo k reakci.

Antioxidační účinek byl vyjádřen v procentuálním poklesu absorbance (měřena při  $\lambda = 525$  nm) oproti slepému vzorku podle vzorce  $Q\% = (1 - A_x/A_0) \cdot$

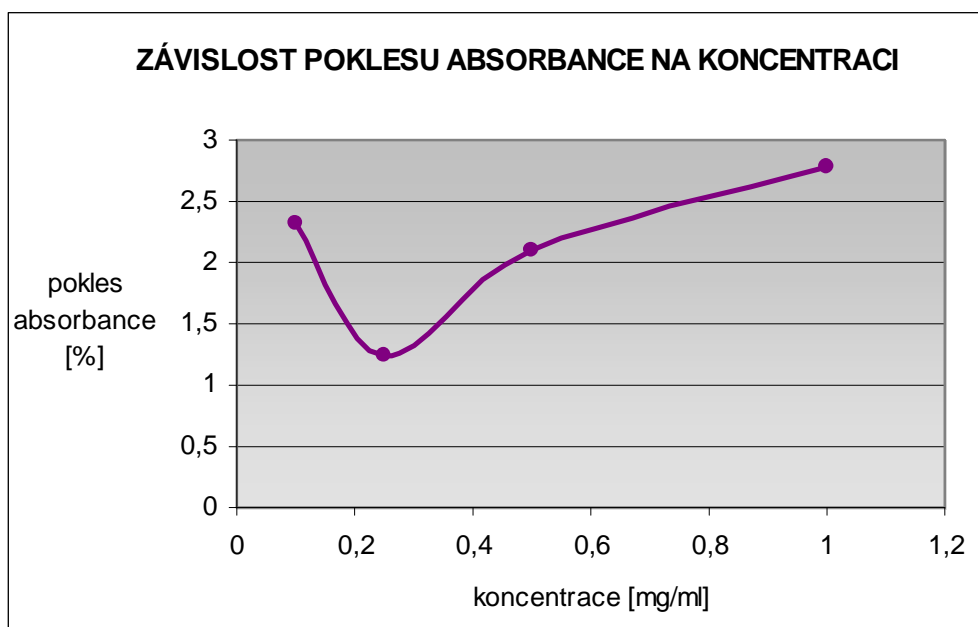
100, kde  $A_x$  je průměrná výška píku měřeného vzorku a  $A_0$  je průměrná výška píku slepého vzorku. Všechna měření byla provedena třikrát. Pro porovnání jednotlivých antioxidantů bývá uváděna hodnota  $EC_{50}$  (mg/ml). Jedná se o koncentraci, jež je potřebná pro snížení absorbance o 50 %. Tato metoda již byla na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové v minulosti využita k měření antioxidační aktivity velkého množství etanolových extraktů z hub (Macáková, 2009 a 2010).

Výsledky antioxidační aktivity jsou uvedeny v tabulkách 5 – 17 a závislost aktivity na koncentraci vzorku na obrázcích 53 – 65. Porovnání všech vzorků při stejných koncentracích je vyobrazeno na obrázcích 66 – 69. Při porovnání se standardními antioxidanty (kys. askorbová –  $EC_{50} = 0,006$  mg/ml, trolox –  $EC_{50} = 0,014$  mg/ml) a vysoce aktivními druhy hub (*Fomitopsis pinicola* (Schwarz.: Fr.) P. Karst –  $EC_{50} = 0,09$  mg/ml, *Gyrodon lividus* (Bull. Ex Fr.) Sacc. –  $EC_{50} = 0,05$  mg/ml), které jsou uvedeny v člancích Macákové (2009 a 2010), byla aktivita téměř u všech měřených druhů hub nízká. Výjimku představoval druh *Leccinum griseum* (Quél.) Singer, u něhož bylo možné jako u jediného stanovit již zmiňovanou hodnotu  $EC_{50} = 0,251$  mg/ml.

#### 4.4.2. Hodnoty naměřených antioxidačních aktivit u sledovaných taxonů

Tab. 5: *Lactarius chrysorrheus* Fr.

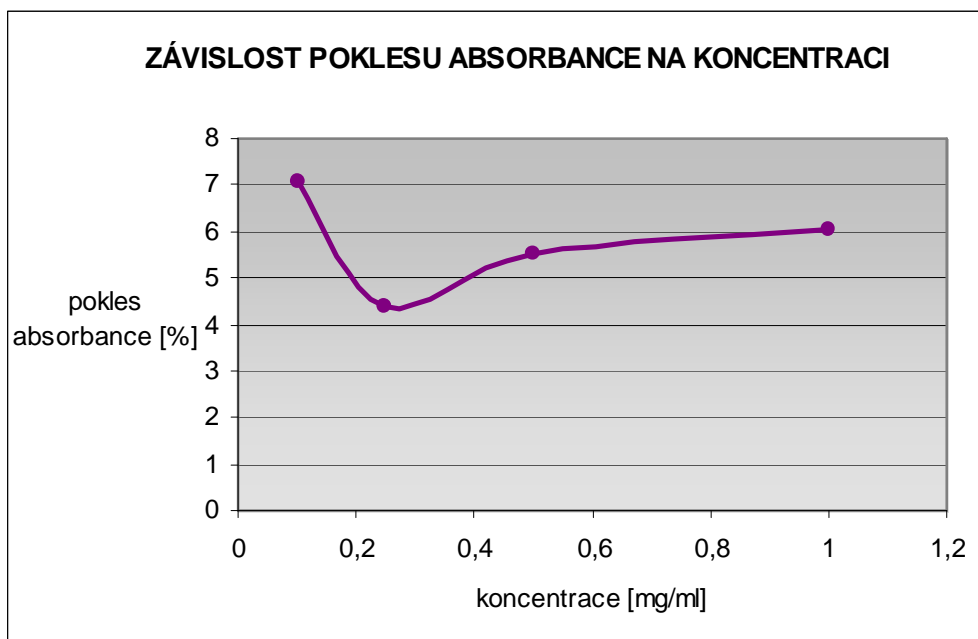
| <b>koncentrace [mg/ml]</b> | <b>pokles absorbance (%)</b> |
|----------------------------|------------------------------|
| 0,1                        | 2,33                         |
| 0,25                       | 1,23                         |
| 0,5                        | 2,09                         |
| 1                          | 2,77                         |



Obr. 53: *Lactarius chrysorrheus* Fr.

Tab. 6: *Boletus impolitus* Fr.

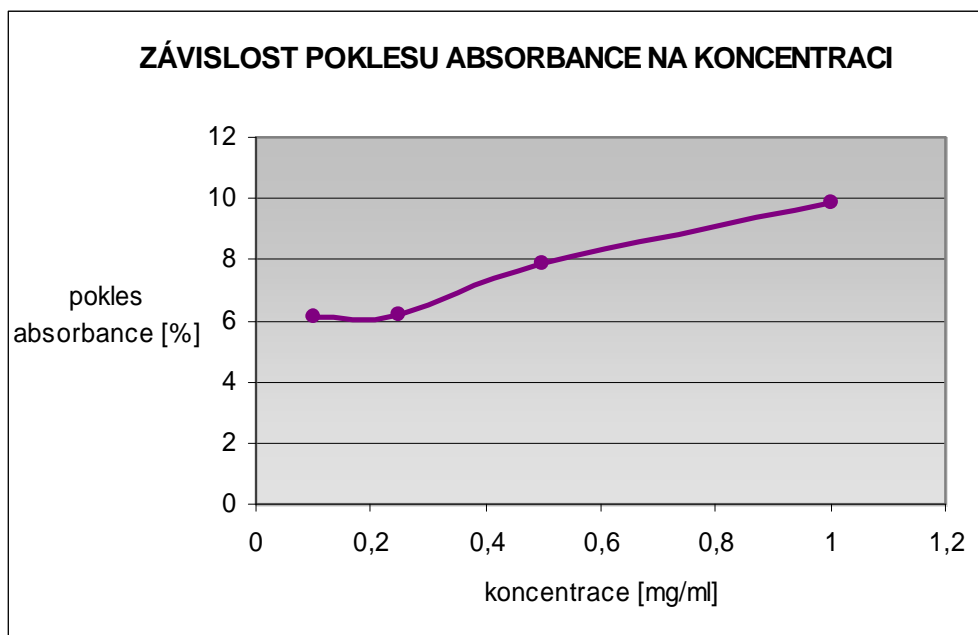
| koncentrace [mg/ml] | pokles absorbance (%) |
|---------------------|-----------------------|
| 0,1                 | 7,07                  |
| 0,25                | 4,41                  |
| 0,5                 | 5,54                  |
| 1                   | 6,04                  |



Obr. 54: *Boletus impolitus* Fr.

Tab. 7: *Lactarius picinus* Fr.

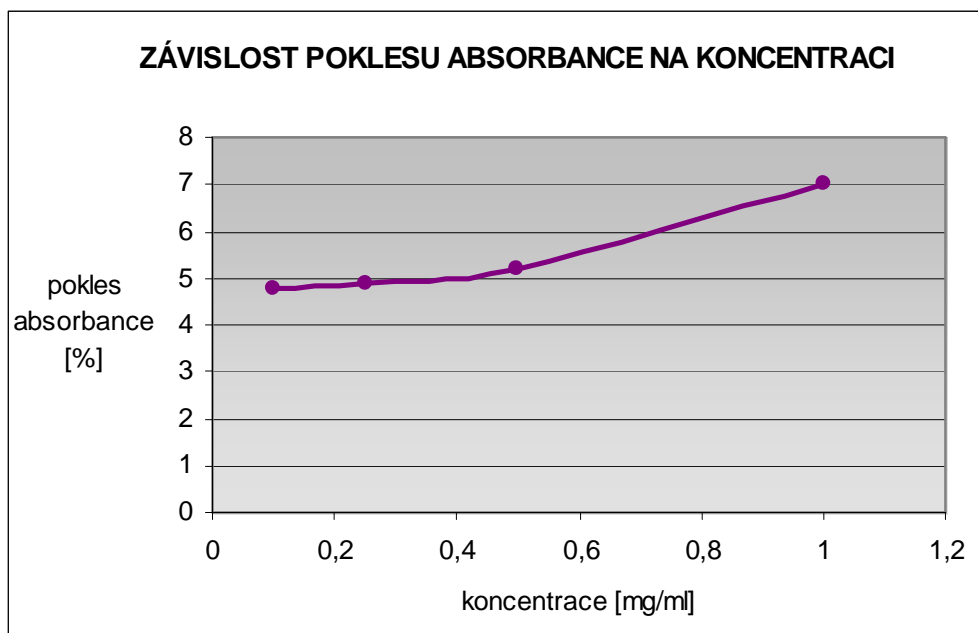
| koncentrace [mg/ml] | pokles absorbance (%) |
|---------------------|-----------------------|
| 0,1                 | 6,11                  |
| 0,25                | 6,21                  |
| 0,5                 | 7,87                  |
| 1                   | 9,87                  |



Obr. 55: *Lactarius picinus* Fr.

Tab. 8: *Clavicornona pyxidata* (Pers.:Fr.) Doty.

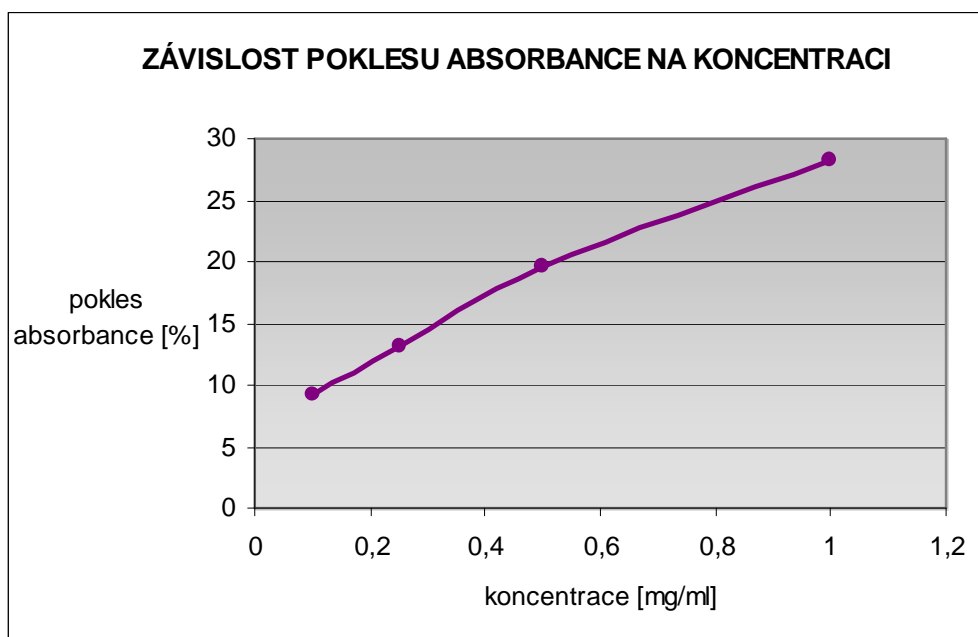
| <b>koncentrace [mg/ml]</b> | <b>pokles absorbance (%)</b> |
|----------------------------|------------------------------|
| 0,1                        | 4,79                         |
| 0,25                       | 4,86                         |
| 0,5                        | 5,17                         |
| 1                          | 7,00                         |



Obr. 56: *Clavicornona pyxidata* (Pers.:Fr.) Doty.

Tab. 9: *Lasiochlaena benzoina* (Wahlenb.) Pouzar.

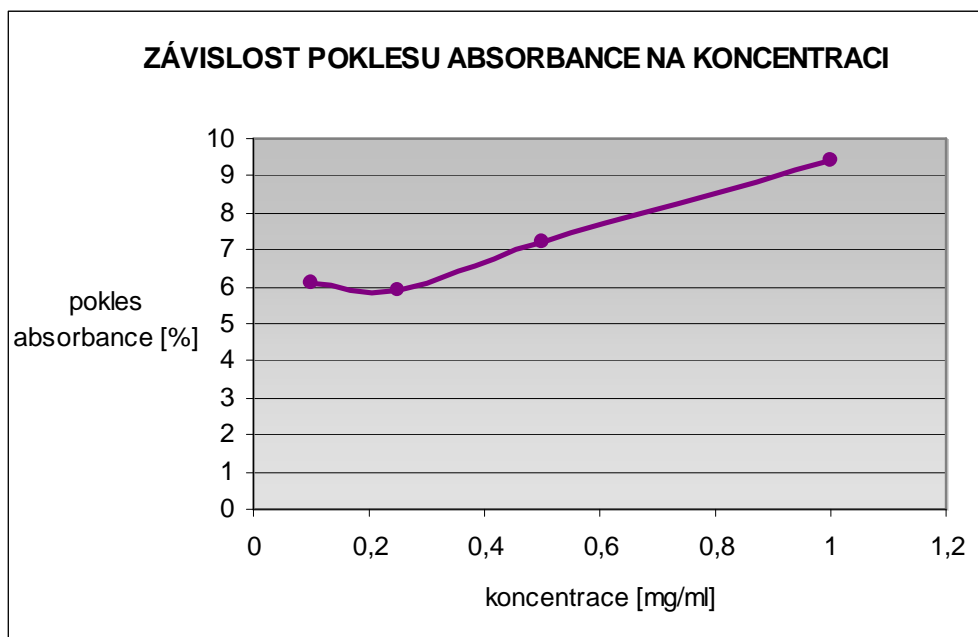
| koncentrace [mg/ml] | pokles absorbance (%) |
|---------------------|-----------------------|
| 0,1                 | 9,30                  |
| 0,25                | 13,12                 |
| 0,5                 | 19,59                 |
| 1                   | 28,22                 |



Obr. 57: *Lasiochlaena benzoina* (Wahlenb.) Pouzar.

Tab. 10: *Lactarius deliciosus* (L.) Gray.

| koncentrace [mg/ml] | pokles absorbance (%) |
|---------------------|-----------------------|
| 0,1                 | 6,11                  |
| 0,25                | 5,93                  |
| 0,5                 | 7,24                  |
| 1                   | 9,39                  |

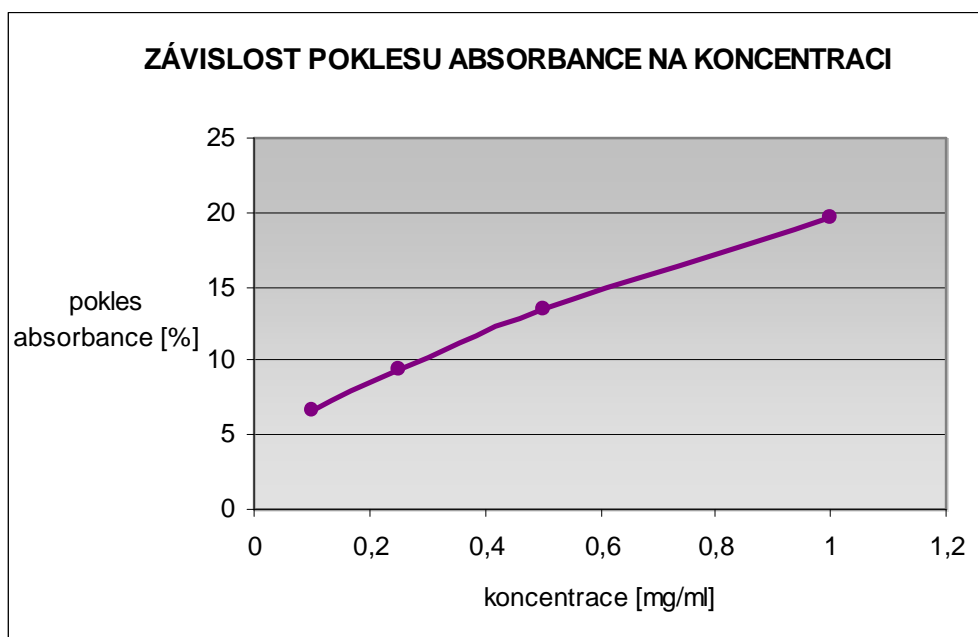


Obr. 58: *Lactarius deliciosus* (L.) Gray.



Tab. 11: *Russula ochroleuca* Pers.

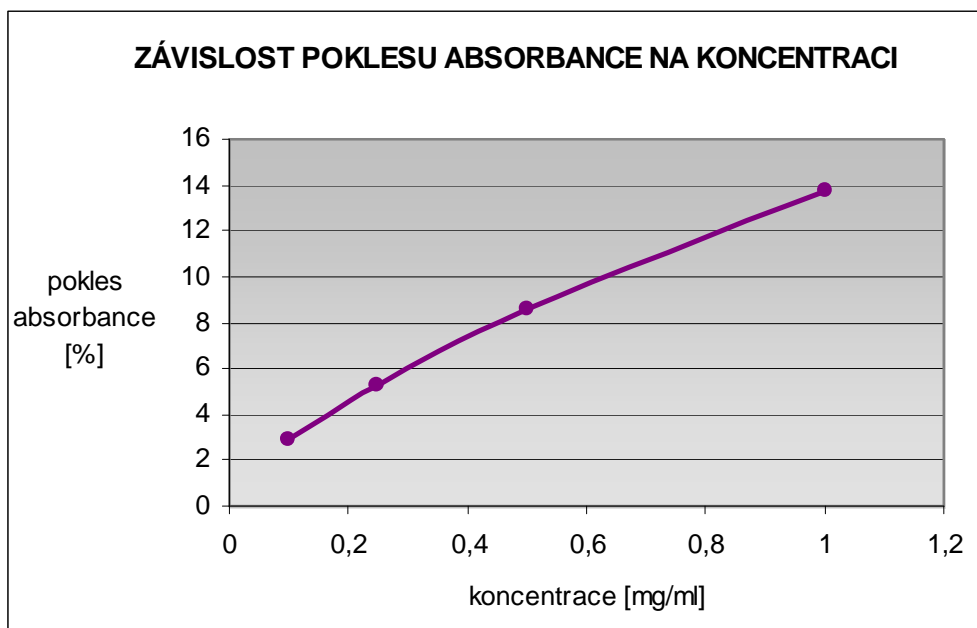
| koncentrace [mg/ml] | pokles absorbance (%) |
|---------------------|-----------------------|
| 0,1                 | 6,62                  |
| 0,25                | 9,41                  |
| 0,5                 | 13,39                 |
| 1                   | 19,61                 |



Obr. 59: *Russula ochroleuca* Pers.

Tab. 12: *Albatrellus confluens* (Alb. et Schw. ex Fr.).

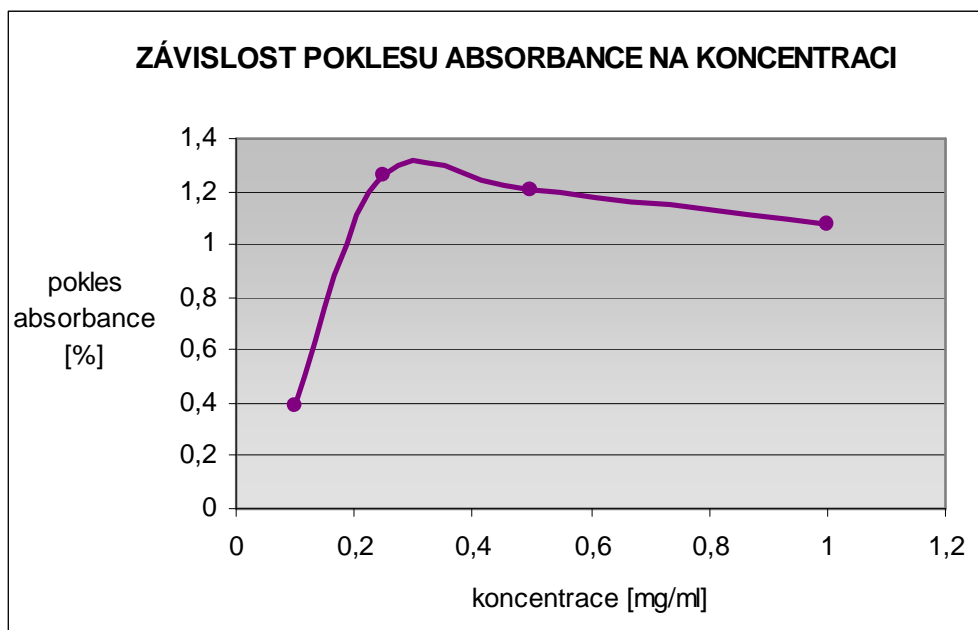
| <b>koncentrace [mg/ml]</b> | <b>pokles absorbance (%)</b> |
|----------------------------|------------------------------|
| 0,1                        | 2,91                         |
| 0,25                       | 5,23                         |
| 0,5                        | 8,54                         |
| 1                          | 13,75                        |



Obr. 60: *Albatrellus confluens* (Alb. et Schw. ex Fr.).

Tab. 13: *Russula rosea* Pers.

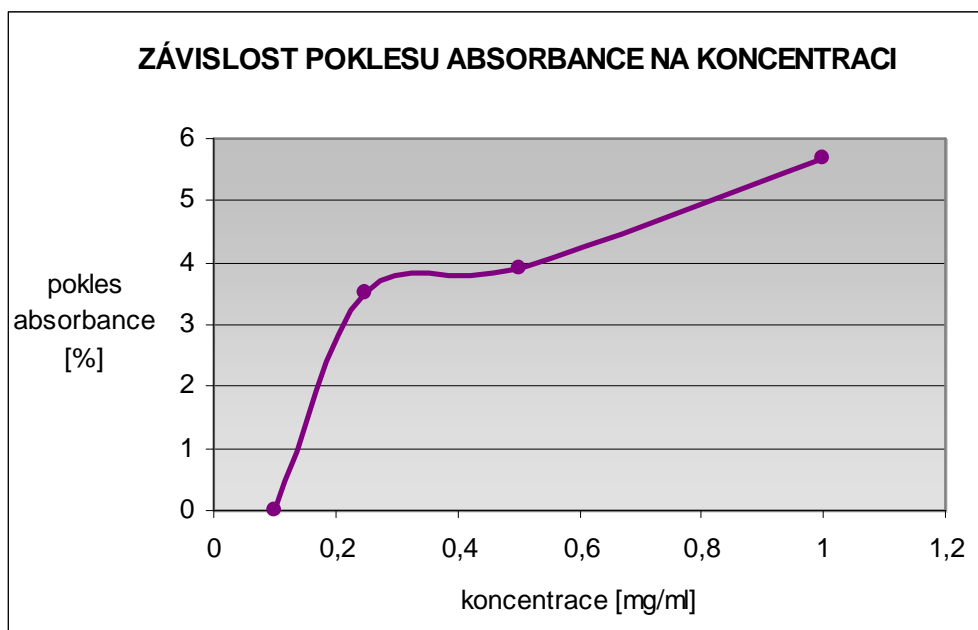
| koncentrace [mg/ml] | pokles absorbance (%) |
|---------------------|-----------------------|
| 0,1                 | 0,39                  |
| 0,25                | 1,26                  |
| 0,5                 | 1,20                  |
| 1                   | 1,08                  |



Obr. 61: *Russula rosea* Pers.

Tab. 14: *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair.

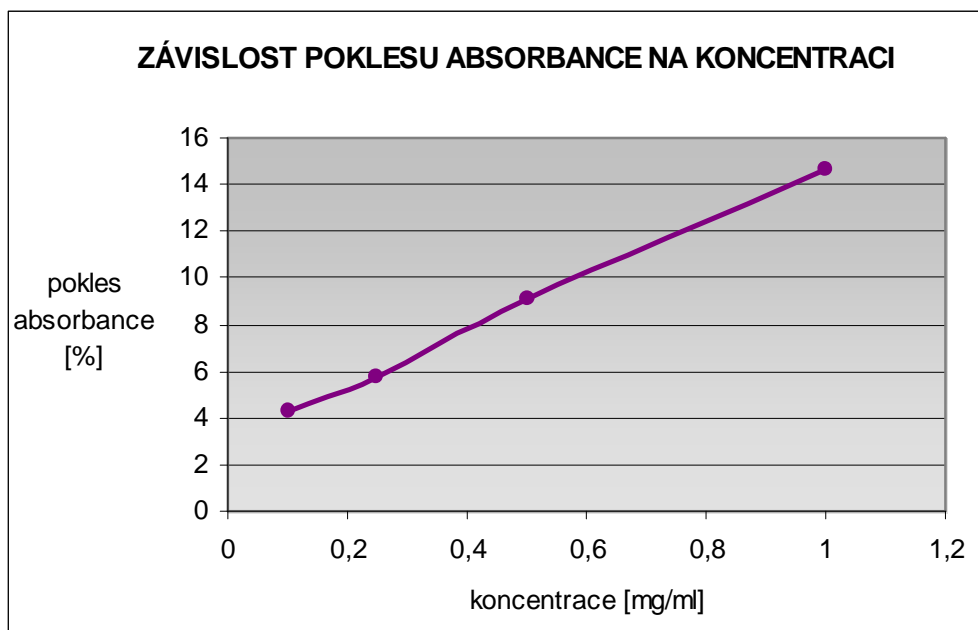
| <b>koncentrace [mg/ml]</b> | <b>pokles absorbance (%)</b> |
|----------------------------|------------------------------|
| 0,1                        | 0                            |
| 0,25                       | 3,50                         |
| 0,5                        | 3,91                         |
| 1                          | 5,69                         |



Obr. 62: *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair.

Tab. 15: *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr.

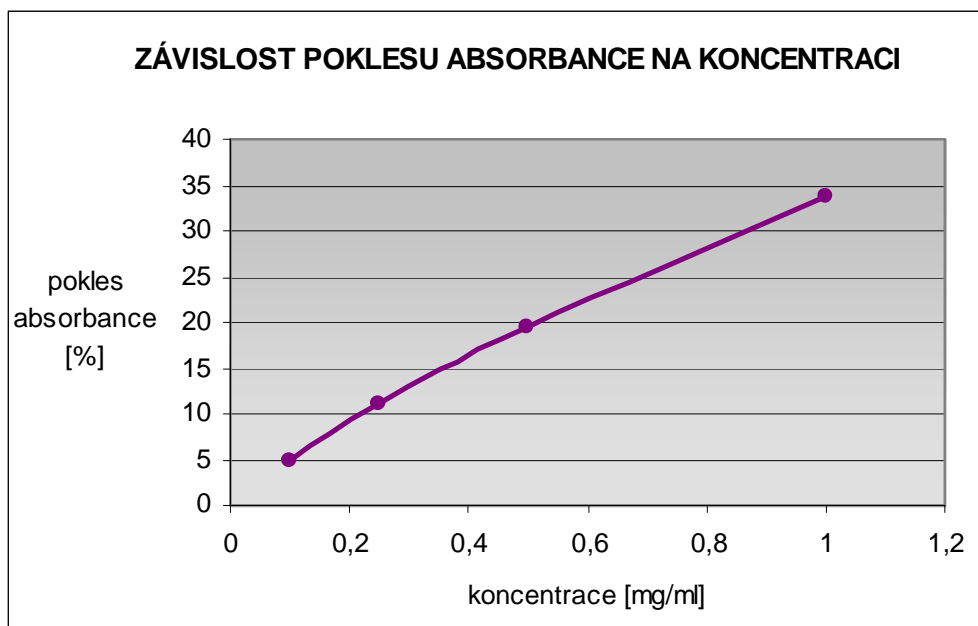
| <b>koncentrace [mg/ml]</b> | <b>pokles absorbance (%)</b> |
|----------------------------|------------------------------|
| 0,1                        | 4,24                         |
| 0,25                       | 5,71                         |
| 0,5                        | 9,09                         |
| 1                          | 14,60                        |



Obr. 63: *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr.

Tab. 16: *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quél.

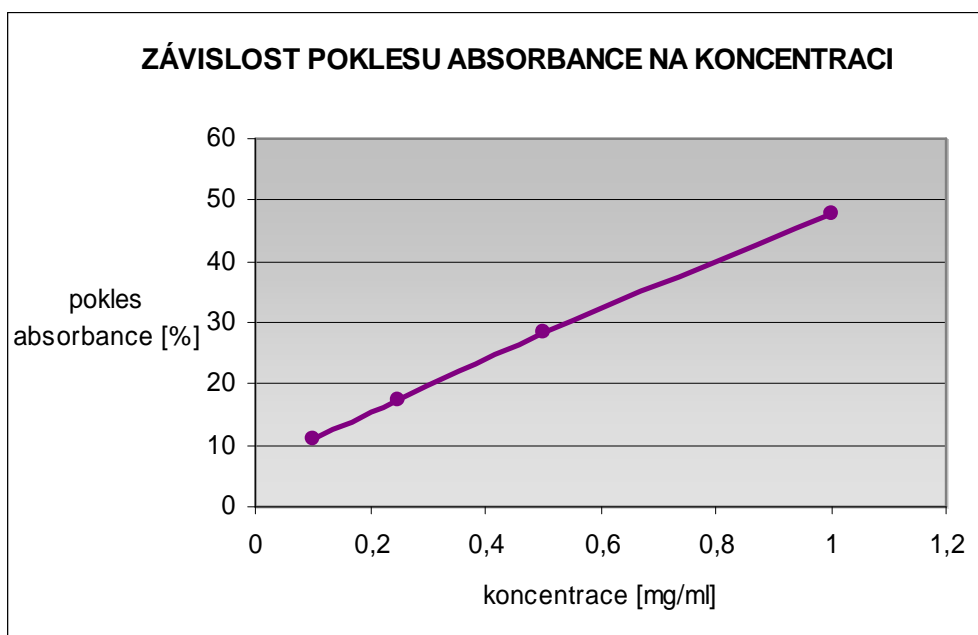
| <b>koncentrace [mg/ml]</b> | <b>pokles absorbance (%)</b> |
|----------------------------|------------------------------|
| 0,1                        | 4,87                         |
| 0,25                       | 10,99                        |
| 0,5                        | 19,38                        |
| 1                          | 33,82                        |



Obr. 64: *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quél.

Tab. 17: *Boletus luridiformis* Rostk.

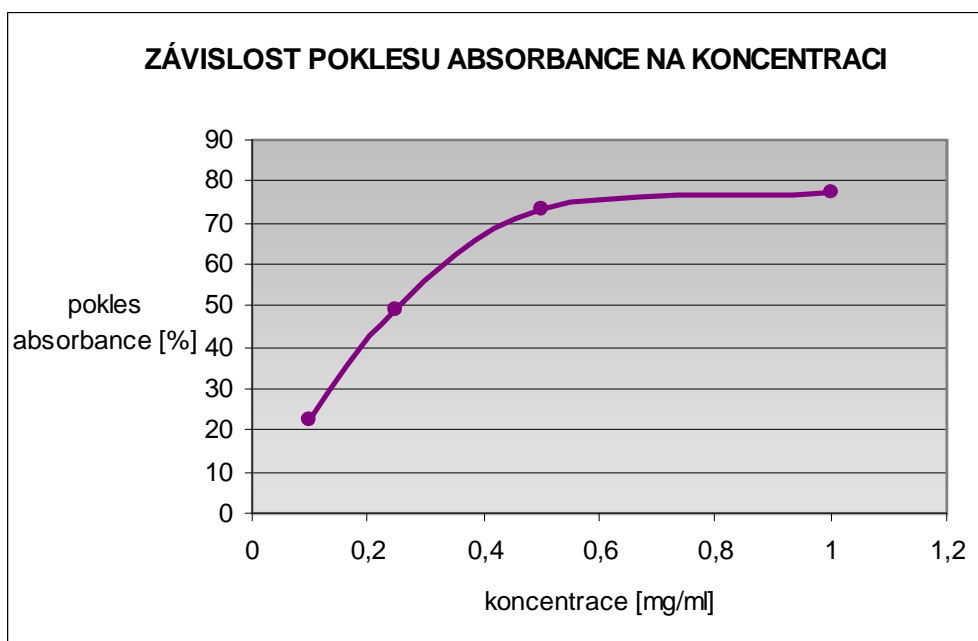
| koncentrace [mg/ml] | pokles absorbance (%) |
|---------------------|-----------------------|
| 0,1                 | 10,91                 |
| 0,25                | 17,22                 |
| 0,5                 | 28,33                 |
| 1                   | 47,65                 |



Obr. 65: *Boletus luridiformis* Rostk.

Tab. 18: *Leccinum griseum* (Quél.) Singer.

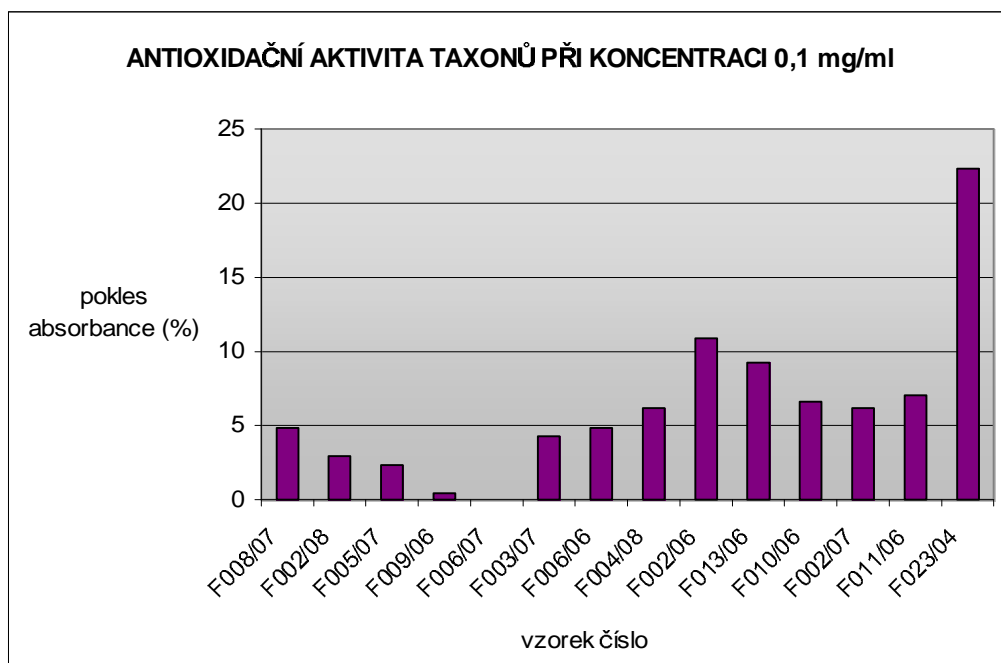
| <b>koncentrace [mg/ml]</b> | <b>pokles absorbance (%)</b> |
|----------------------------|------------------------------|
| 0,1                        | 22,33                        |
| 0,25                       | 49,25                        |
| 0,5                        | 73,15                        |
| 1                          | 77,59                        |



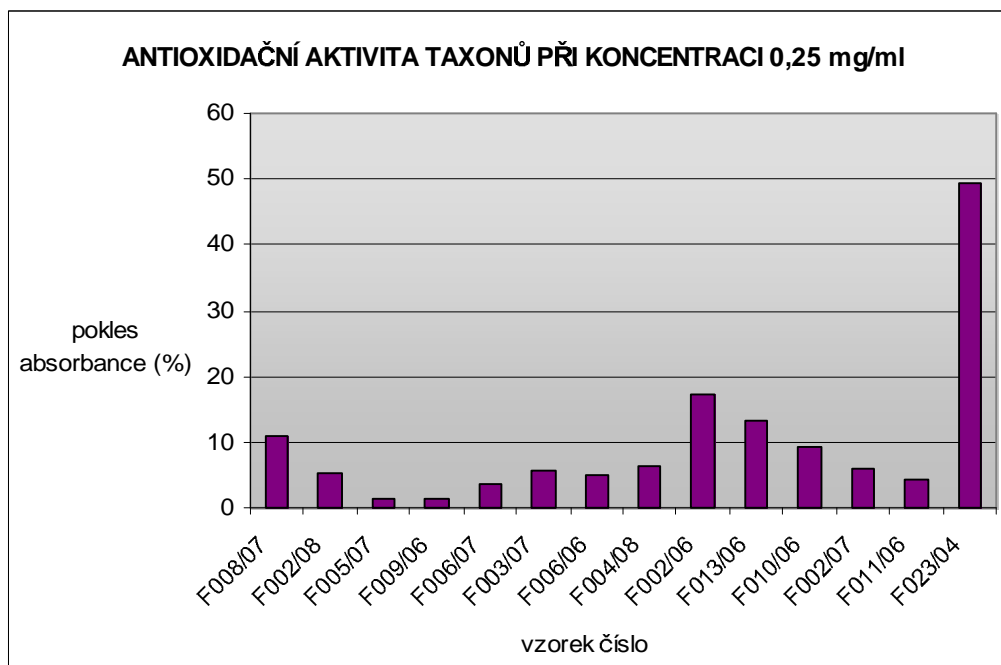
Obr. 66: *Leccinum griseum* (Quél.) Singer.



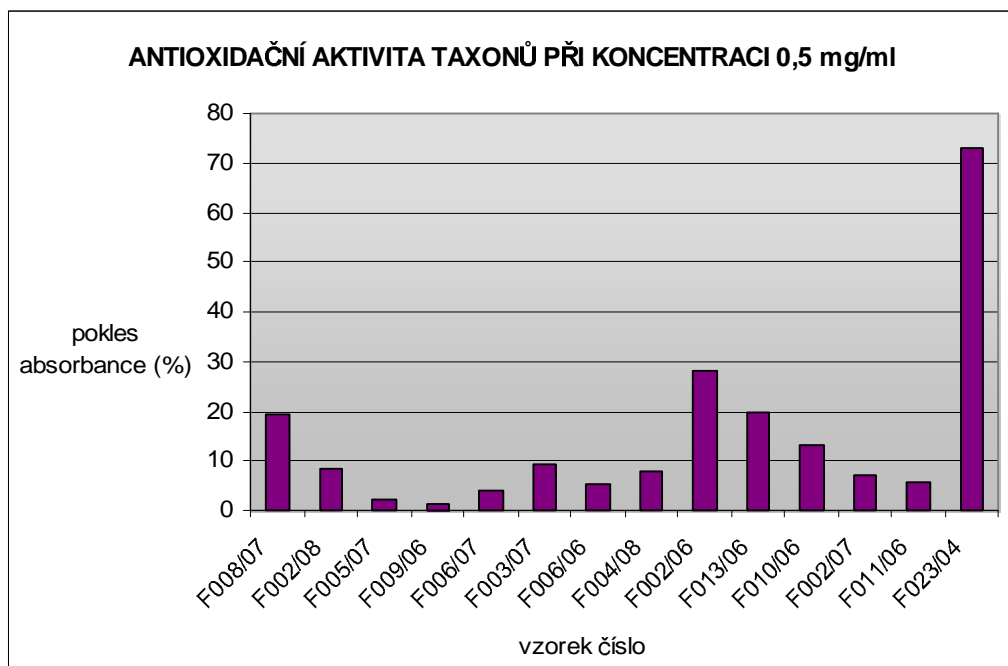
#### 4.4.3. Porovnání antioxidační aktivity taxonů při jednotlivých koncentracích



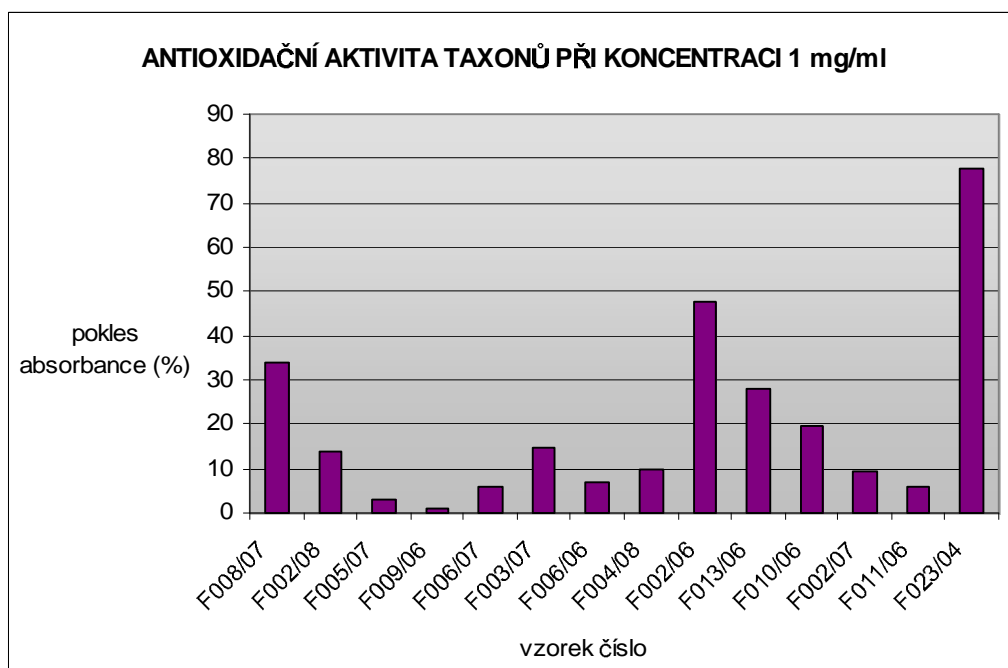
Obr. 67: Antioxidační aktivita taxonů při koncentraci 0,1 mg/ml.



Obr. 68: Antioxidační aktivita taxonů při koncentraci 0,25 mg/ml.



Obr. 69: Antioxidační aktivita taxonů při koncentraci 0,5 mg/ml.



Obr. 70: Antioxidační aktivita taxonů při koncentraci 1 mg/ml.

## 5. Diskuze

Cílem této práce bylo detekovat druhy hub, jejichž extrakty vykazují významné hodnoty antioxidačních aktivit. Je součástí širokého fytochemicko-farmaceutického výzkumu rostlin a vyšších hub probíhajícího na Katedře botaniky a ekologie farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Předložená diplomová práce je součástí prvotního screeningu a v budoucnosti by mohla hrát roli (ve smyslu jakéhosi návodu či pomůcky) v izolaci a identifikaci antioxidačních sloučenin či jiných látek obsažených v houbách.

Antioxidanty jsou látky, které zabraňují oxidačnímu působení volných radikálů v tkáních. Volné radikály mohou být příčinou vzniku onemocnění, komplikovat jeho průběh, nebo jej zhoršovat. Antioxidanty se hojně využívají v prevenci vzniku onemocnění, ale také v samotné terapii nemoci jako doplňková léčba. Zájem o antioxidanty narůstá nejen mezi vědeckými pracovníky, ale také širokou veřejností (vlivem internetu, větší edukace pacienta, mnohem větší důraz je kladen na skutečnost, že každý pacient zodpovídá sám za své zdraví). Na trhu jsou dostupné v nesčetné řadě potravních doplňků, jež antioxidanty obsahují v různém množství a formách, dále se pak vyskytují v běžné potravě.

Za poslední čtyři desetiletí značně vzrostl zájem o houby, a to nejen díky zdroji aminokyselin, vitamínů, minerálů a jeho možného využití jako dietetika (nízká výživová hodnota hub), ale především pro jejich schopnost působit antioxidačně, antibakteriálně, antivirotický, pro svoji schopnost snižovat hladinu cholesterolu, glykémie, atd. V Tab. 1 jsou uvedeny konkrétní příklady druhů hub a jejich účinky na organismus (podle Jablonský a Šásek, 2006).

Co se týče taxonů, které byly v rámci této práce testovány, rozhodně stojí za zmínku *Albatrellus confluens* (Alb. et Schw. ex Fr.), jež obsahuje vysoké koncentrace albakonolu (nový prenatalylovaný resorcinol), který mj. může inhibovat růst lidských nádorových buněk díky jeho působení na DNA topoisomérázu. Dále může být albakonol potenciálním imunosupresivním a protizánětlivým agens (Q. Liu et al., 2008). *Albatrellus confluens* (Alb. et Schw. ex Fr.) obsahuje dále grifolin, který jak se ukázalo má farmakologické a mikrobiologické účinky. Grifolin byl

v roce 1950 definován jako antibiotikum. Dále se prokázalo, že snižuje cholesterol s limitovanou nebo žádnou toxicitou a má např. antioxidační účinky. Grifolin inhibuje růst některých rakovinotvorných buněk a indukuje signifikantní apoptózu (Mao Ye et al., 2007). Další významný druh je pak *Clavicornia pyxidata* (Pers.: Fr.) Doty s obsahem kyseliny klavikoronové, která má schopnost inhibovat reverzní transkriptázu (Erkel a Anke, 1991).

Testovaným materiálem v této diplomové práci byly plodnice hub, které byly zmrazeny tekutým dusíkem a do doby jejich zpracování uskladněny v plastických sáčkách při teplotě  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V čase jejich konečného zpracování byly plodnice rozmixovány tyčovým mixérem a sonikovány v 70% ethanolu v ultrazvukové lázni (jak se ukázalo v předchozích pokusech, 70% EtOH je vhodným rozpouštědlem pro extrakci polárních i méně polárních látek).

Extrakty byly odpařeny na vakuové rotační odparce a dále následovala lyofilizace. Lyofilizovaný extrakt byl přeplněn do vzduchotěsných penicilinek, převrstven argonem a uzavřen. Extrakty byly uchovávány v mrazničce a staly se výchozím materiálem pro stanovení antioxidační aktivity a pro hodnocení tenkovrstvou chromatografií (TLC). Při tomto postupu nelze s jistotou tvrdit, že v lyofilizovaném extraktu budou všechny látky stejné jako v čerstvé plodnici, jelikož během jednotlivých fází zpracování plodnic může dojít k rozkladu některých obsahových látek.

Lyofilizací byly získány práškovité extrakty s hnědým, žlutohnědým, nebo červenohnědým zbarvením, jež se dobře rozpouštěly v 70% EtOH. Ve dvou případech se nepodařilo připravit práškový extrakt a výsledný produkt měl viskózní charakter (tento stav se vysvětluje přítomností vyššího obsahu vonných látek).

K vyhodnocení ethanolických extraktů hub byla provedena tenkovrstvá chromatografie a obsahové skupiny látek extraktů byly zjištěny pomocí selektivních detekcí. Při vyvíjení byly použity dvě soustavy, jež byly sestaveny na základě předešlých experimentů. Soustava S1 (toluen + HCOOEt + HCOOH = 50 + 40 + 10) se používá k separaci méně polárních látek, zatímco soustava S2 (PrOH + voda = 90 + 10) je vhodná pro látky polární.

Z provedených tenkovrstvých chromatografií lze vyvodit následující závěry: obsah méně polárních i polárních látek byl u všech sledovaných taxonů téměř

vyrovnaný. Co se týče primárních metabolitů, tak v největší míře byly zastoupeny aminokyseliny. Jejich přítomnost byla prokázána pomocí detekce D12: Isatin – octan zinečnatý (Obr. 43 a 44). Přítomnost byla více patrná po použití soustavy S2. Všechny extrakty, až na druh *Russula rosea* Pers. a *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr., vykazovaly pozitivní reakci. Aminokyseliny se dále prokázaly detekcí D14: Ninhydrin – kolidin (Obr. 47 a 48). I v tomto případě byla přítomnost aminokyselin razantnější po použití polárnější soustavy S2 a podle předpokladu byly primární metabolity nalezeny ve všech lyofilizátech. U testovaného druhu *Lactarius deliciosus* (L.) Gray byly již v minulosti tyto látky detekovány a blíže specifikovány (Ayer a Trifonov, 1994). Podobně proběhlo i hodnocení sacharidů. Jejich přítomnost byla opět výraznější za použití soustavy S2. Detekce proběhla pomocí D6: Difenylamin – anilin – kyselina fosforečná (Obr. 31 a 32) a dále D4: Anisaldehyd – kyselina sírová (Obr. 27 a 28), kterou se nestanovovala jen přítomnost sacharidů, ale také terpenů a steroidů. Jak je vidět z rozdílů všech čtyř chromatogramů soustav S1 a S2, přítomnost terpenů a steroidů, stejně tak i cukrů, je ve všech taxonech patrná. V předchozích experimentech byly blíže specifikovány cukerné struktury u druhu *Russula ochroleuca* Pers. (Gao et al., 2001).

Co se týče sekundárních metabolitů, byla provedena detekce na laktony pomocí D11: Hydroxylamin – chlorid železitý (Obr. 41 a 42), která byla pozitivní na startu u všech druhů u soustavy S1 kromě druhů *Lactarius chrysorrheus* Fr., *Boletus impolitus* Fr. a *Russula rosea* Pers. Dřívějším testováním byl u druhu *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr. zjištěn červený pigment – gomfilakton (Jaegers et al., 1981) – a u druhu *Lactarius chrysorrheus* Fr. – chysorrhelakton (De Bernardi et al., 1993).

Detekce na alkaloidy D7: Dragendorffovo činidlo podle Muniera (Obr. 33 a 34) byla pozitivní na startu i na dráze pouze u druhu *Leccinum griseum* (Quél.) Singer, a to v soustavě S1 i S2. Jak dokazuje ve své práci Bastida et. al (1987), byly již alkaloidy prokázány u druhu *Boletus impolitus* Fr., ale v rámci této práce nedošlo u zmiňovaného druhu k pozitivní reakci na startu ani na dráze.

Detekce na karboxylové kyseliny pomocí D9: Glukóza – anilin (Obr. 37 a 38) zjistila u všech lyofilizovaných extraktů pozitivní reakce na startu na přítomnost karboxylových kyselin zřetelné jak v soustavě S1, tak S2. Na drahách byly zjištěny reakce v případě soustavy S2, a to u všech druhů. U taxonů *Russula ochroleuca*

Pers., *Lactarius deliciosus* (L.) Gray a *Clavicornia pyxidata* (Pers.: Fr.) Doty byly již dříve karboxylové kyseliny blíže specifikovány (Gao et al., 2001, Barros et al. 2009, Erkel a Anke, 1991, Ayer a Trifonov, 1994).

Přítomnost fenolických sloučenin byla prokázána detekcemi D5, D8, D10 a D15. U detekce D5: 2,6-Dibromchinonchlorimid (Gibbsovo činidlo, Obr. 29 a 30) byly u soustavy S1 detekovány fenolické sloučeniny na startu u všech druhů, na dráze byly detekovány u houby *Albatrellus confluens* (Alb. et Schw. ex Fr.) a *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair. U soustavy S2 nebyla přítomna pozitivní reakce na startu ani na dráze u druhu *Leccinum griseum* (Quél.) Singer, *Lasiochlaena benzoina* (Wahlenb.) Pouzar, *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quél., *Boletus luridiformis* Rostk. Při detekci D8: Fast Blue B salt (Obr. 35 a 36) byly fenolické sloučeniny prokázány na startu u méně polární soustavy S1 u všech taxonů, zatímco u polární soustavy S2 byly všechny lyofilizáty pozitivní jak na startu, tak na drahách. Detekce na fenoly a aminy pomocí D15: Paulyho činidlo (diazotovaná kyselina sulfanilová, Obr. 49 a 50) ukázala u soustavy S1 pozitivní reakci na startu u všech taxonů kromě druhu *Lactarius chrysorrheus* Fr., *Albatrellus confluens* (Alb. et Schw. ex Fr.), *Russula rosea* Pers., *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair, *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr., *Boletus luridiformis* Rostk. U soustavy S2 byly reakce na startu pozitivní u všech taxonů kromě druhu *Lactarius chrysorrheus* Fr., *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr., *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quél., *Boletus luridiformis* Rostk. Na dráze byly detekovány pozitivní reakce u soustavy S2 s výjimkou druhu *Lactarius chrysorrheus* Fr., *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair, *Gomphidius maculatus* (Scop.) Fr., *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quél. a *Boletus luridiformis* Rostk.

Detekce na redukující látky díky D10: Hexakynoželezitan draselný – chlorid železitý (Obr. 39 a 40) zahrnuje i průkaz přítomnosti fenolických látek. I když je u některých taxonů patrná pozitivní reakce u soustavy S2 i na drahách, nelze tuto detekci považovat za zcela reprezentativní. Příčinou ne příliš výrazných výsledků mohou být nevyhovující vlastnosti některého z činidel.

U detekce pomocí D16: Vanilin – kyselina sírová (Obr. 51 a 52) na fenoly, steroidy a vyšší alkoholy byly detekovány výrazné pozitivní reakce u všech druhů hub jak na startu tak na drahách.

Při detekci na přítomnost sterolů D13: 1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina – kyselina chloristá (Obr. 45 a 46) došlo k výrazným reakcím u obou soustav. Pouze druhy *Albatrellus confluens* (Alb. et Schw. ex Fr.) a *Boletus luridiformis* Rostk. nebyly na drahách u soustavy S2 pozitivní.

Detekce D3: Acetanhydrid – kyselina sírová (Liebermann-Burchardovo činidlo, Obr. 25 a 26) ukazuje na přítomnost nejen sterolů, ale také steroidů a triterpenů. Výrazné pozitivní reakce byly přítomny u obou soustav jak na drahách, tak na startech. Z rozdílů obou posledně zmiňovaných detekcí lze těžce odhadovat míru zastoupení steroidů a triterpenů v jednotlivých taxonech (lze zde ale předpokládat jejich částečnou přítomnost, jak vyplynulo z posuzování detekcí D4 a D6).

Z výsledků provedených chromatografií lze usuzovat, že testované taxony obsahovaly zejména aminokyseliny, karboxylové kyseliny, cukry, fenoly a steroly, což koresponduje s dostupnou literaturou.

Při stanovení antioxidační aktivity byla využita automatizovaná metoda sekvenční injekční analýzy (SIA) založená na odbarvení DPPH radikálu. Díky své rychlosti a citlivosti je tato metoda vhodná pro vykonávání rutinních testů (screeningů) přítomnosti různých antioxidantů ve velkých sériích lyofilizovaných extraktů. Koncentrace lyofilizátů, které byly během stanovení použity se pohybovaly v rozmezí 0,1 až 1 mg/ml.

Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u druhu *Leccinum griseum* (Quél.) Singer (Obr. 66, Tab. 18), kdy pokles absorbance dosahoval hodnoty 77 % (při koncentraci 1 mg/ml) a byl tak vůbec nejvyšší ze všech měřených vzorků. Hodnoty poklesu absorbance tohoto druhu i v jiných koncentracích byly výrazně větší než u ostatních druhů v daných hladinách koncentrace (viz Obr. 67 až 70). Jako u jediného testovaného vzorku bylo možné také stanovit hodnotu  $EC_{50} = 0,251$  mg/ml (koncentrace nutná pro snížení absorbance o 50 %).

Druhá nejvyšší aktivita byla naměřena u druhu *Boletus luridiformis* Rostk. (Obr. 65, Tab. 17), jehož hodnota poklesu absorbance při koncentraci 1 mg/ml byla 47 %.

Třetí nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovala houba *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quél. (Obr. 64, Tab. 16), kdy hodnota poklesu absorbance při koncentraci 1 mg/ml dosahovala 33 %. Oproti ostatním vzorkům, kromě dvou prvně uvedených, dosahoval významných hodnot také pokles absorbance při koncentraci 0,5 mg/ml.

Čtvrtým druhem, jež stojí za zmínku, je *Lasiochlaena benzoina* (Wahlenb.) Pouzar. (Obr. 57, Tab. 9), jejíž hodnota poklesu absorbance při koncentraci 1 mg/ml byla 28 %. Relativně vysokých hodnot (nejvyšších po *Leccinum griseum* (Quél.) Singer a *Boletus luridiformis* Rostk.) také dosahovala absorbance v koncentracích 0,1 a 0,25 mg/ml (viz Obr. 67 a 68).

Zbývající houby, kromě druhu *Russula ochroleuca* Pers. s poklesem absorbance 19,7 % při koncentraci 1 mg/ml, vykazovaly nízký pokles absorbance s hodnotami výrazně pod 20 % při koncentraci 1 mg/ml.

Exponenciální průběh křivky vykazovaly všechny extrakty kromě druhu *Lactarius chrysorrheus* Fr., *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Russula rosea* Pers. a *Boletus impolitus* Fr. U všech těchto druhů se vyskytla nižší hodnota poklesu absorbance u koncentrovanějších vzorků (u druhu *Russula rosea* Pers. byl pokles konstantní již od koncentrace 0,25 mg/ml). Nicméně tyto poklesy jsou řádově kolem 1 %, což je celkově zanedbatelné (avšak v rámci vzorku ne) a dalo by se to připisovat chybě v měření. U druhu *Boletus impolitus* Fr. (Obr. 54, Tab. 6) byl pokles absorbance u koncentrace 0,1 mg/ml vyšší než u koncentrace 1 mg/ml a mezi hodnotami poklesu absorbance při koncentraci 0,1 a 0,25 mg/ml byl rozdíl větší než 2,5 %. Tyto anomálie v měření lze vysvětlit např. tím, že extrakt při dané vyšší koncentraci nebyl zcela čirý, anebo byl výrazně zabarvený (bez těchto negativních vlivů by pak mohl být skutečný pokles absorbance při této koncentraci vyšší).

I přes stanovenou hodnotu  $EC_{50}$  u druhu *Leccinum griseum* (Quél.) Singer byly naměřené hodnoty antioxidačních aktivit u 14 sledovaných taxonů v porovnání s běžně používanými antioxidanty (kyselina askorbová a trolox) nízké.



## 6. Literatura

- ANTONÍN, V. Encyklopedie hub a lišejníků. Praha: Libri: Academia, 2006. 471 s.
- AYER, W. A.; TRIFONOV, L. S. Aromatic Compounds from liquid cultures of *Lactarius deliciosus*. *Journal of Natural Products*. 1994, 6, s. 839-841.
- BARROS, L., DUENAS, M., FERREIRA, I., BAPTISTA, P., SANTOS-BUELGA, C. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, 47, s. 1076-1079.
- BASTIDA, J., VILADOMAT, F., LLABRES, J. M., CODINA, C. Screening of higher fungi from Catalonia for alkaloids-II. *International Journal of Crude Drug Research*. 1987, 25, 3, s. 129-132.
- BIELLI, E. Houby: obsáhlý rádce pro určování a sběr hub. J. Váňa. Praha: Euromedia Group - Ikar, 2001. 224 s.
- DE BERNARDI, M., GARLASCHELLI, L., TOMA, L., VIDARI, G., VITA-FINZI, P. The Chemical Basis of Hot-tasting and Yellowing of the Mushrooms *Lactarius chrysorrheus* and *L. scrobiculatus*. *Tetrahedron*. 1993, 49, 7, s. 1489-1504.
- ERHART, J., ERHARTOVÁ, M., PŘÍHODA, A. Houby ve fotografii. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1997. 255 s.
- ERKEL, G.; ANKE, T. Antibiotics from Basidiomycetes XLI clavicornic acid : a novel inhibitor of reverse transcriptases from *Clavicornia pyxidata* (Pers. ex Fr.) Doty. *The Journal of Antibiotics*. 1991, 1, s. 29-37.

- GAO, J., SHEN, J., YANG, X., LIU, J. Constituents of *Russula ochroleuca*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*. 2001, 3, s. 385-393.
- GRÜNERT, H.; GRÜNERT, R. Houby. E. Pátková. Praha: Knižní klub, 2005. 288 s.
- HAGARA, L.; ANTONÍN, V.; BAIER, J. Velký atlas hub. Praha: Ottovo Nakladatelství, 2006. 432 s.
- HELLWIG, V., NOPPER, R., MAULER, F., FREITAG, J., LIU, J., DING, Z., STADLER, M. Activities of Prenylphenol Derivatives from Fruitbodies of *Albatrellus* spp. on the Human and Rat Vanilloid Receptor 1 (VR1) and Characterisation of the Novel Natural Product, Confluentin. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 2003, 2, s. 119–126.
- HRDINA, V., HRDINA, R., JAHODÁŘ, L., MARTINEC, Z., MĚRKA, V. Přírodní toxiny a jedy. Praha: Galén, 2004. 302 s.
- JABLONSKÝ, I.; ŠAŠEK, V. Jedlé a léčivé houby: pěstování a využití. Praha: Brázda, 2006. 263 s.
- JAEGERS, E., STEFFAN, B., VON ARDENNE, R., STEGLICH, W. Fungal pigments. 38. Metabolites of 1,2,4-trihydroxybenzene from fruiting bodies of *Gomphidius maculatus* and *G. glutinosus* (Boletales). *Journal of Biosciences*. 1981, 36, s. 488-489.
- KALÁČ, P. Houby: víme, co jíme? České Budějovice: Dona, 2008. 114 s.
- KAWAGISHI, H., TANAKA, A., SUGIYAMA, K., MORI, H., SAKAMOTO, H., ISHIGURO, Y., KOBAYASHI, K., URAMOTO, M.. A pyradine-derivative from the mushroom *Albatrellus confluens*. *Phytochemistry*. 1996, 2, s. 547-548.
- KEIZER, G. J. Houby. L. Hauzerová. 2. vyd. Praha: Rebo, 2005. 288 s.

- KLÁN, J. Co víme o houbách. Praha: SPN, 1989. 310 s.
- KOTHE, H. Houby : určování a sběr. J. Váňa. Praha: Ikar, 2007. 288 s.
- KOVÁŘ, L. Breviř o houbách. Praha: Olympia, 1999. 154 s.
- LÆSSØE, T. Houby. J. Váňa. Praha: Knižní klub, 2004. 304 s.
- LIU, Q., SHU, X., SUN, A., SUN, Q., ZHANG, CH., AN, H., LIU, J., CAO, X.  
Plant-derived small molecule albaconol suppresses LPS-triggered  
proinflammatory cytokine production and antigen presentation of dendritic  
cells by impairing NF-kappaB activation. *International Immunopharmacology*.  
2008, 8, s. 1103-1111.
- MACÁKOVÁ, K., OPLETAL, L., POLÁŠEK, M., SAMKOVÁ, V., JAHODÁŘ, L.  
Free-radical Scavenging Activity of some European Boletales. *Natural Product  
Communications*. 2009, 4, 2, s. 261-264.
- MACÁKOVÁ, K., OPLETAL, L., POLÁŠEK, M., SAMKOVÁ, V. Free-radical  
Scavenging Activity of some European Polyporales. *Natural Product  
Communications*. 2010, 5, 6, s. 923-926.
- MIKULCOVÁ, M. Výchova houbařů v Čechách : aneb, Co v atlasech nenajdete. 1.  
Praha : Olympia, 2006. 205 s.
- MISASA, H., MATSUI, Y., UEHARA, H., TANAKA, H., ISHIHARA, M.,  
SHIBATA, H. Tyrosinase Inhibitors from *Albatrellus confluens*. *Bioscience,  
Biotechnology, and Biochemistry*. 1992, 10, s. 1660-1661.
- OPLETAL, L.; KOULA, V. *Daidalea : Houby* [online]. 2011 [cit. 2011-02-20].  
Dostupné z WWW: <<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/Myco.asp>>

ORTEMBERGOVÁ, A. Mládneme s antioxidanty. Praha: Ivo Železný, 2002. 126 s.

POLÁŠEK, M., SKÁLA, P., OPLETAL, L., JAHODÁŘ, L. Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004, 379, s. 754-758.

RACEK, J. Oxidační stres: a možnosti jeho ovlivnění. Praha: Galén, 2003. 89 s.

SONTAG, B., RÜTH, M., SPITELLER, P., ARNOLD, A., STEGLICH, W., REICHERT, M., BRINGMANN, G. Chromogenic Meroterpenoids from the Mushrooms *Russula ochroleuca* and *R. viscida*. *Eur. J. Org. Chem.*. 2006, 4, s. 1023–1033.

STAHL, E.: Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook. Springer Berlin, Berlin-Heidelberg-New York 1969. 1065 s.

SVRČEK, M. *Houby*. Praha : Aventinum, 1996. 279 s.

ŠANŠŮNOVÁ, M., SCHWARZ, V. (ed). Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a v klinickej biochémií. 2. vyd. Martin: Osveta, 1977, 520 s.

ŠKUBLA, P. *Tajomné huby*. Bratislava : [s.n.], 1989. 154 s.

ŠTÍPEK, S. BOROVANSKÝ, J., ČEJKOVÁ, J. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4314 s.

VÁŇA, J.. Systém a vývoj hub a houbových organismů. Praha: Karolinum, 1996. 164 s.

- VON ARDENNE, R.; STEGLICH, W. 1,2,4-Trihydroxybenzene, a characteristic constituent of Gomphidius (Boletales). *Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie*. 1974, 7-8, s. 446.
- WANG, F.; LUA, D.; LIU, J.. Aurovertin E, a New Polyene Pyrone from the Basidiomycete Albatrellus confluens. *The Journal of Antibiotics*. 2005, 6, s. 412-415.
- YANG, X., QIN, CH., WANG, F., DONGA, Z., LIU, J. A New Meroterpenoid Pigment from the Basidiomycete Albatrellus confluens. *Chemistry & Biodiversity*. 2008, 3, s. 484-489.
- YANG, X., LUO, D., DONG, Z., LIU, J. Two New Pigments from the Fruiting Bodies of the Basidiomycete Lactarius deliciosus. *Helvetica Chimica Acta*. 2006, 5, s. 988-990.
- YE, M., LUO, X., LI, L., SHI, Y., TAN, M., WENG, X., LI, W., LIU, J., CAO, Y. Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom Albatrellus confluens, induces cell-cycle arrest in G1 phase via the ERK1/2 pathway. *Cancer Letters*. 2007, 2, 258, s. 199-207.
- YOUNGSON, R. Antioxidanty, cesta ke zdraví: Jak odstranit vliv volných radikálů. Brno: Jota, 1995. 143 s.
- ZHENG, Y.; SHEN, Y. Clavicolides A and B, Sesquiterpenoids from the Fermentation Products of Edible Fungus Clavicornia pyxidata. *Organic Letters*. 2009, 1, s. 109-112.
- ZHENG, Y., LUA, CH., ZHENG, Z., LIN, X., SUA, W., SHEN, Y. New Sesquiterpenes from Edible Fungus Clavicornia pyxidata. *Helvetica Chimica Acta*. 2008, 11, s. 2174-2180.

ZHOU, Z., LIU, R., JIANG, M., ZHANG, L., NIU, Y., ZHU, Y., DONG, Z., LIU, J.

Two New Cleistanthane Diterpenes and a New Isocoumarine from Cultures of the Basidiomycete *Albatrellus confluens*. *Chem. Pharm. Bull.*. 2009, 9, s. 975—978.

ZICHA, O., HRB, J., MAŇAS, M., NOVÁK, J. *BioLib : Biological Library* [online].

1999-2011 [cit. 2011-02-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.biolib.cz/>>

## ABSTRAKT

**Zvonková, L.** Biologická aktivita makromycet – A. **Diplomová práce 2011, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 96 s.**

Klíčová slova: houby, obsahové látky, volné radikály tenkovrstvá chromatografie (TLC), antioxidační aktivita, sekvenční injekční analýza (SIA)

V rámci této diplomové práce bylo zpracováno 14 taxonů hub z řádu *Boletales*, *Pezizales*, *Polyporales* a *Russulales*. Z plodnic byly připraveny za přesně stanovených podmínek lyofilizované extrakty, jež byly následně použity pro detekci obsahových skupin látek a pro zjištění antioxidační aktivity. Na detekci jednotlivých skupin látek byla použita tenkovrstvá chromatografie (TLC), jež probíhala vzestupným způsobem v předem nasycených komorách. Z výsledků chromatografií bylo zjištěno, že testované extrakty hub obsahovaly zejména aminokyseliny, cukry, karboxylové kyseliny, fenoly a steroly, což koresponduje s dostupnou literaturou. Na obsah alkaloidů (na dráze i startu) byl pozitivní druh *Leccinum griseum* (Quél.) Singer. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metody sekvenční injekční analýzy (SIA) založené na odbarvení DPPH radikálu. Tato metoda je pro svou rychlost a citlivost vhodná pro vyhodnocování antioxidační aktivity u rutinních screeningů velkého počtu vzorků. Nejvyšší aktivitu vykazoval druh *Leccinum griseum* (Quél.) Singer ( $Q_{0,5} = 77 \%$ ), u něhož jako u jediného bylo možné pro svou relativně vysokou antioxidační aktivitu (v rámci testovaných druhů) stanovit hodnotu  $EC_{50} = 0,251 \text{ mg/ml}$  (koncentrace nutná pro snížení absorbance o 50 %). Nicméně v porovnání s běžně používanými antioxidanty (kyselina askorbová a trolox) je aktivita stále o dva řády nižší.



## ABSTRACT

**Zvonková, L.** Biological activity of macromycetes – A. Charles University in Pragu, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 96 pp.

Key words: mushrooms, compounds, free radicals, thin-layer chromatography (TLC), antioxidant activity, sequential injection analysis (SIA)

Fourteen different mushrooms taxons (orders – *Boletales*, *Pezizales*, *Polyporales* and *Russulales*) were examined in this diploma thesis. Lyophilized extracts were prepared under the precise set of conditions from the fruiting bodies and consequently used for recognition of compounds groups and for antioxidant activity detection. Thin-layer chromatography (TLC) was used for the determination of compounds groups. This TLC process proceeded in ascending development in pre-saturated chambers. From TLC results it was detected that tested mushrooms extracts contained especially amino-acids, saccharides, carboxylic acids, phenolic substances, sterols, which corresponds with the available literature. Alkaloids were also detected, especially in *Leccinum griseum* (Quél.) Singer extract. Antioxidant activity was set using sequential injection analysis method (SIA), which is based on DPPH radical bleaching. This method is very suitable, due to its rapidness and sensitivity, for evaluation of multiplicity routine antioxidant activity screenings. The species *Leccinum griseum* (Quél.) Singer showed out the highest antioxidant activity ( $Q_{0,5} = 77\%$ ) and thus was only one suitable species (due to its relatively high antioxidant activity among others) for latter calculation of  $EC_{50}$  value (which has value 0,251 mg/ml). Nevertheless, as compared with ordinarily used antioxidants (ascorbic acid and trolox), the antioxidant activity is still two orders lower.